

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки
Національної академії наук України»

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МОРГУН БОГДАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 575.2+602.6:577.21:582.542.1

ДИСЕРТАЦІЯ
ПОЛІПШЕННЯ КУЛЬТУРНИХ ЗЛАКІВ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧНОЇ
ІНЖЕНЕРІЇ ТА МАРКЕР-ДОПОМІЖНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

03.00.22 – молекулярна генетика
біологія

Подается на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук.
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.



_____ Б.В. Моргун

Науковий консультант Кучук Микола Вікторович, доктор біологічних наук,
професор, академік НАН України

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Моргун Б.В. Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.22 – молекулярна генетика – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», м. Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена створенню методами генетичної інженерії рослин пшениці і кукурудзи, стійких до гербіцидів, а також розробці методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для селекції та генотипування злакових культур за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

У результаті виконання роботи розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин. Визначено структуру гена *shp1* моху *P. patens* та підтверджено факт наявності подібних послідовностей в різних таксонах рослин. Для виявлення досліджуваної генетичної послідовності в зразках мохів підібрано дві пари праймерів: SHP1F1–SHP1R1 та SHP1F3–SHP1R3. У більшості проаналізованих зразків мохів ампліфіковано фрагменти цієї послідовності на матриці ДНК та кДНК, що може свідчити про наявність у них гена *shp1*. Виділено кодуючу послідовність ДНК генів малих гідрофобних білків SHP та проведено її клонування у вектор pUC19. Сиквеновано послідовності кДНК білків SHP1 та SHP2 *Warnstorfia fontinaliopsis*.

Виділено ДНК генів NADH-дегідрогенази щучника антарктичного, та певні їх послідовності клоновано у вектор pUC19. Створено бібліотеку рекомбінантних клонів. Сиквеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*. Встановлено наявність в мітохондріальній ДНК генів 1-ої та 5-ої субодиниць NADH-дегідрогенази, 26S рибосомальної РНК. Проведено біоінформатичний аналіз послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica*. Показано високу (понад 90 %) гомологію з мітохондріальними геномами представників родини Злакових (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii* та ін.).

Оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Вперше вивчено вплив синтетичних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Показано, що найбільш ефективним є використання у середовищі 0,15 мг/л піклораму у поєднанні з 0,5 мг/л БАП, за якого спостерігається швидке утворення морфогенних ділянок та найбільша кількість пагонів. Досліджено вплив β -лактамного антибіотика тиментину на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої та показано, що він має властивості регулятора росту. Проте тиментин може бути використаний лише як додатковий стимулятор морфогенетичних процесів.

Розроблено протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*, який включає використання: оптичної щільності клітин бактеріальної суспензії $OD_{600} = 0,4$ оп.од.; ацетосирінгону концентрацією 200 мкМ; антибіотика паромоміцину в якості селективного агента. З використанням оптимізованого протоколу проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур пшениці генетичними векторами p014 та pCB203. Частота трансформації калюсів, отриманих з незрілих зародків, вектором p014 у сорту 'Подільська' становила 2,7 %, а у сорту 'Зимоярка' – 2,4 %. Після використання вектора pCB203 частота трансформації такого ж калюсу сорту 'Зимоярка', становила 1,2 %, а калюсу

апикального походження – 1,6 % (сорт ‘Зимоярка’) та 1,8 % (сорт ‘Подольнянка’), що свідчить про однакову ефективність використання калюсу пшениці м’якої різного походження для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*.

Оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, в результаті чого частота трансформації пшениці зросла до 20,7 %. Підтверджено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації рослин *in planta*. За її наявності частота трансформації становила 2,3 %, а за відсутності – 15,6 % (ген *bar*) та 20,7 % (ген *nptII*). Показано залежність частоти отримання трансгенних рослин *T. aestivum* методом *in planta* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму. Для сорту ‘Подольнянка’ температурний режим $t \approx 24^{\circ}\text{C}$ і помірна вологість повітря сприяють максимальній ефективності зав’язування насіння ($40,6 \pm 1,5$ %) та отриманню трансформантів (7,3 %). При зниженні температури до 16°C зменшується ефективність перенесення Т-ДНК у рослинний геном. При підвищенні температури до 27°C частота появи трансгенних за геном *bar* рослин дещо знижується і становить 2 %. Вперше отримано рослини пшениці сортів ‘Подольнянка’ та ‘Зимоярка’ стійкі до фосфінотрицину (гербіцид Баста®). Трансгенна природа рослин підтверджена методами ПЛР, ЗТ-ПЛР.

У трансгенних калюсних ліній пшениці, отриманих шляхом біолістичної трансформації, методом IRAP-аналізу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону SIRE-1, та виявлено їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. В спектрах продуктів ампліфікації ДНК відмічено появу нових ампліконів, що свідчить про активацію та транспозицію даного МГЕ. Підтверджено, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів. У генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, які містять

дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, у спектрах продуктів ампліфікації ДНК не відмічено появи нових ампліконів, що свідчить про відсутність активації транспозиційної активності МГЕ. Відсутність поліморфізму ДНК у трансгенних рослин ймовірно може бути пов'язана з явищем РНК-інтерференції, яка пригнічує активність ретротранспозонів.

Оптимізовано окремі етапи протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Виділено гібрид R₂PLS61×PLS61 з високою та тривалою регенераційною здатністю. Показано перспективність використання гліфосату у концентрації 0,01 мМ для добору трансгенних форм кукурудзи. Встановлено позитивний ефект антибіотика цефотаксиму на регенераційну здатність калюсів кукурудзи, отриманих з незрілих зародків, та негативний – фосфінотрицину та паромоміцину. Виявлено, що кількість регенерантів, отриманих на селективних середовищах із гліфосатом, більша при щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,3 оп.од. порівняно з 0,4 оп.од. За допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* отримано трансгенні рослини кукурудзи, які несуть цільовий ген *cp4 epsps*, продукт якого надає стійкості до гліфосату. В результаті проведених експериментів з біолістичної трансформації вектором рАНС25 були отримані стійкі до фосфінотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляли активність ферменту β-глюкуронідази. Трансгенна природа отриманих рослин була підтверджена за допомогою ПЛР.

Проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин, зокрема кукурудзи, ріпаку та сої, на сільськогосподарських полях окремих областей України. Також визначено наявність продуктів переробки трансгенної сої в харчових продуктах торгівельної мережі України. Для цього розроблена нова вдосконалена методика детекції трансформаційних подій на основі полімеразної ланцюгової реакції. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій MON810, GA21 та NK603 показало, що середня частота їх зустрічальності в Україні станом на весну 2009 року,

становить приблизно 4 %. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність трансгенних форм засвідчила наявність трансформаційних подій NK603 та Bt176 з частотою 5–10 %.

Ідентифікація трансгенного статусу гербіцидостійкого ріпаку на території Київської області підтвердила присутність у декількох рослин глюфосинату амонію та гліфосату, трансгена *bar* і трансформаційної події GT73 з трансгеном *cp4 epsps*. Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах показало, що з 45 опрацьованих зразків 29 містять у своєму складі ген *lectin*, специфічний для сої, що відповідно вказує на присутність добавок сої в них. З 29 зразків 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої (Київська, Черкаська та Кіровоградські області), 1 зразок харчового продукту, що представлений соєвим білком іноземного виробництва для спортсменів. Цей факт являється прямим свідченням того, що на території цих областей вирощується трансгенна (ГМ) соя.

Розроблено дев'ять систем на основі IRAP, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур. Досліджено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами та показано рівень генетичної відмінності між вивченими сортами цих видів. Виявлено високу ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону Sukkula як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів Wilma07 і Nikita у дослідженнях геному ячменю.

Встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10, для яких відсоток виявленого поліморфізму становить, відповідно, 50 % та 23,07 %. Побудовано філогенетичне дерево, в результаті чого встановлено, що зразки сортів 'Ятрань 60' і 'Наталка', а також 'Славна' і 'Спасівка' мають подібний генотип.

Мономорфні фрагменти, що виявляються при електрофорезі продуктів ПЛР у сортів різних злаків, чіткіше позначають спільність структурно-

функціональної організації їх геномів. При цьому кожен з вивчених сортів має свій певний спектр ампліфікованих IRAP та REMAP продуктів (фрагментів), що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. Аналіз отриманих результатів, представлених у вигляді дендрограм коефіцієнтів генетичної схожості, показав, що вивчені сорти характеризуються порівняно високим рівнем міжсортного поліморфізму.

Здійснено хімічний мутагенез тритикале для відбору рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*. Проведено молекулярне дослідження мутантних рослин з використанням IRAP-маркерів, в результаті якого підтверджено зміни у геномі тритикале під дією мутагенів.

Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі, і обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для *Xgwm508* = $2,94 \pm 1,28$ %, *Xgwm193* = $3,96 \pm 1,51$ %, *Xgwm626* = $2,98 \pm 1,29$ %, *Xgwm219* = $6,77 \pm 2,08$ %.

Аналіз рослин F_4 і F_5 поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS виявив, що присутність гена *Gpc-B1* зумовлює статистично достовірне підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію. Комплексний аналіз вмісту загального білка зернівок у рослин F_5 покоління методом К'ельдаля та NIR показав, що ген *Gpc-B1* зумовлює підвищення вмісту білка на 14 % порівняно з вихідним сортом 'Куяльник'. В цілому, виконані комплексні дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1*, інтродукованого з *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці з поліпшеною якістю зерна. Застосована біотехнологія маркер-допоміжної селекції забезпечила створення новітнього селекційного матеріалу пшениці з

підвищеним вмістом білка та корисних мікроелементів у зерні у поєднанні з високими господарсько-цінними властивостями рослин.

Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* методом ПЛР. Здійснено оцінку 44 сімей F_5 покоління, носіїв гена *Gpc-B1*, на наявність алельних субодиниць генів *Glu-1* запасних білків. За трьома локусами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16 найбільш цінних сімей, які мають оптимальну для хлібопекарської якості алельну складову локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення.

Методом ПЛР визначено алельний склад генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які відповідають за консистенцію ендосперму пшениці. У багатофакторному дисперсійному аналізі впливу різних алелів генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на твердозерний тип ендосперму гібридів пшениці було виявлено спільний вплив ($p < 0,01$) комбінацій алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*. На відміну від гібридів, де було показано сильний вплив ($p < 0,001$) на тверду консистенцію ендосперму наявності тих чи інших алелів гена *Pinb-D1*, у комерційних сортів української селекції такого впливу виявлено не було, що свідчить про імовірну залежність дії гена *Pinb-D1* від генетичного оточення.

Для детекції гібридів м'якої пшениці F_1 та F_2 створено та використано маркерну систему для визначення перенесення модифікованого локусу із геном *SBEIIa*, який викликає збільшення накопичення амілози в зерні. Відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки.

За допомогою системи ДНК-маркерів визначено алельний склад генів *Psy1*, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні злакових культур, у 162 сортів та гібридів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції. Серед дослідженої вибірки було відібрано зразки пшениці, у яких можна очікувати найвищу концентрацію каротиноїдів: 'Доброчинна', 'Косовиця', 'Одеська

265', 'Білява', 'Полба' (Німеччина), 'Писанка', 'Панна', 'Лідер', 'Одеська 51', 'Селянка', 'Повага', 'Лановий', 'Супутниця'.

Показано, що використання молекулярно-генетичних маркерів може бути ефективним для аналізу геномів пшениці на наявність алелів генів PPO, що відповідають за активність поліфенолоксидази.

Встановлено, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Показано, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації. На підставі цитогенетичного аналізу встановлено, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

Створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації озимої пшениці різного напрямку використання.

Ключові слова: *Triticum aestivum*, *Zea mays*, генетична інженерія, трансгенні рослини, моніторинг, молекулярно-генетичні маркери, гени, алелі, мутації, інтрогресія, різноманітність, транслокації 1BL.1RS, 1AL.1RS, сорти-інновації.

SUMMARY

Morgun B.V. Improvement of cultivated cereals by methods of genetic engineering and marker-associated selection. – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of the Doctor of Sciences in Biology, the specialty 03.00.22 – molecular genetics – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to the creation of herbicide – resistant wheat and corn plants by genetic engineering methods, as well as to the development of methodological and practical principles of using molecular genetic markers for selection and genotyping of cereals by genes that determine important economic traits.

As result of the work the principles of vector construction and selection of DNA sequences on the example of a model species *Physcomitrella patens* and an Antarctic plant *Deschampsia antarctica*, which can be used for genetic engineering of plants, were developed. The structure of the *shp1* gene of moss *P. patens* was determined and the presence of similar sequences in different plant taxa was confirmed. To detect the studied genetic sequence in moss samples, two pairs of primers were selected: SHP1F1 – SHP1R1 and SHP1F3 – SHP1R3. In most of the analyzed moss samples, fragments of this sequence were amplified on the DNA and cDNA template, which may indicate the presence of the *shp1* gene. The DNA coding sequence of the genes of small hydrophobic SHP proteins was isolated and its cloning into the pUC19 vector was performed. The cDNA sequences of SHP1 and SHP2 *Warnstorfia fontinaliopsis* proteins were sequenced.

DNA of NAD-H dehydrogenase genes of *D. antarctica* was isolated and certain sequences were cloned into the vector pUC19. A library of recombinant clones has been created. The nucleotide fragments of the mitochondrial genome of *D. antarctica* were sequenced and analyzed. The presence of genes of the 1st and 5th subunits of NADH dehydrogenase, 26S ribosomal RNA in mitochondrial DNA was established. A bioinformative analysis of *D. antarctica* mitochondrial DNA sequences was performed. High (over 90 %) homology with mitochondrial genomes of members of the Cereal family (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii*, etc.) is shown.

The conditions of *Agrobacterium*-mediated transformation of bread wheat in *in vitro* culture were optimized. The influence of synthetic growth regulators – picloram and dicamba – on the frequency of regeneration from callus wheat callus

of apical origin was studied for the first time. It is shown that the most effective is the use in the environment of 0.15 mg/l picloram in combination with 0.5 mg/l BAP for which there is a rapid formation of morphogenic areas and the largest number of shoots. The effect of β -lactam antibiotic timentin on morphogenetic processes in bread wheat was studied and shown to have growth-regulating properties. However, timentin can be used only as an additional stimulator of morphogenetic processes.

A protocol of *Agrobacterium*-mediated transformation of bread wheat in *in vitro* culture was developed, which includes the use of: optical density of cells of bacterial suspension $OD_{600} = 0.4$ op.un.; acetosyringone at a concentration of 200 μ M; antibiotic paromomycin as a selective agent. Using an optimized protocol, *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat callus cultures by genetic vectors p014 and pCB203 was performed. The frequency of transformation of calluses obtained from immature embryos by the vector p014 of the cultivar 'Podolyanka' was 2.7 %, and of the cultivar 'Zymoyarka' – 2.4 %. After using the vector pCB203, the frequency of transformation of the callus of the 'Zymoyarka' variety was 1.2 %, and of the callus of apical origin – 1.6 % ('Zymoyarka' variety) and 1.8 % ('Podolyanka' variety), which indicates the same efficiency of using the callus of wheat which is of different origin for *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro*.

The method of *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta* was optimized, as a result of which the frequency of wheat transformation increased to 20.7 %. The negative effect of sucrose in the inoculation medium on the frequency of transformation of plants *in planta* was confirmed. In its presence, the transformation frequency was 2.3 %, and in its absence – 15.6 % (*bar* gene) and 20.7 % (*nptII* gene). The dependence of the frequency of transgenic *T. aestivum* plants by the *in planta* method on environmental conditions, in particular temperature, is shown. For the 'Podolyanka' variety, the temperature regime $t \approx 24$ °C and moderate humidity contribute to the maximum efficiency of seed tying (40.6 ± 1.5 %) and obtaining transformants (7.3 %). When the temperature drops to

16 °C, the efficiency of T-DNA transfer into the plant genome decreases. When the temperature rises to 27 °C, the frequency of transgenic plants in the *bar* gene decreases slightly and is 2 %. For the first time, wheat plants of ‘Podolyanka’ and ‘Zimoyarka’ varieties resistant to the phosphinothricin (herbicide Basta®) were obtained. Transgenic nature of plants is confirmed by PCR, RT-PCR.

In transgenic callus lines of wheat obtained by bioballistic transformation, the level of polymorphism of DNA sites flanked by inverted LTR repeats of SIRE-1 retrotransposon was analyzed by IRAP analysis and their differences from non-transgenic forms by genetic structure were revealed. The appearance of new amplicons was observed in the spectra of DNA amplification products, which indicates the activation and transposition of this MGE. It has been confirmed that the insertion of foreign DNA is able to induce transposition of mobile genetic elements. In genetically modified wheat plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation *in vitro* culture containing double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene in the spectra of DNA amplification products, no appearance of new amplicons was observed, indicating the absence of activation of transposition activity. The absence of DNA polymorphism in transgenic plants may be related to the phenomenon of RNA interference, which inhibits the activity of retrotransposons.

The individual stages of the protocol of *Agrobacterium*-mediated transformation of maize *in vitro* are optimized. Dedicated hybrid R2PLS61 × PLS61 with high and long regenerative capacity. The prospects of using glyphosate at a concentration of 0.01 mm for the selection of transgenic forms of corn are shown. The positive effect of the antibiotic cefotaxime on the regenerative capacity of corn calluses obtained from immature embryos and the negative effect of phosphinothricin and paromomycin were established. It was found that the number of regenerants obtained on selective media with glyphosate is higher at a cell density of agrobacterial suspension of 0.3 optical units compared to 0.4 op.un. Using the *Agrobacterium*-mediated transformation method *in vitro*, transgenic maize plants were obtained that carry the target gene *cp4 epsps*, the product of

which confers resistance to glyphosate. As a result of experiments on biolistic transformation with the vector pAHC25, phosphinothricin-resistant regenerating plants were obtained, in which the activity of the enzyme β -glucuronidase was detected. The transgenic nature of the obtained plants was confirmed by PCR.

The distribution of transgenic plants, in particular corn, rape and soybeans, in agricultural fields of some regions of Ukraine was monitored. The presence of transgenic soybean products in the food products of the trade network of Ukraine was also determined. For this purpose, a new improved method of detection of transformation events based on polymerase chain reaction has been developed. A study of maize in Kyiv region for the presence of transformation events MON810, GA21 and NK603 showed that the average frequency of their occurrence as of spring 2009 is about 4 %. Examination of samples of corn seeds of Dnipropetrovsk region for the presence of transgenic forms showed the presence of transformation events NK603 and Bt176 with a frequency of 5–10 %.

Identification of the transgenic status of herbicide-resistant rape in the territory of Kyiv region confirmed the presence of ammonium glufosinate and glyphosate, bar transgene and GT73 transformation event with *cp4 epsps* transgene in several plants. A study of the content of GM soy in food showed that of the 45 processed samples – 29 contain the gene lectin specific for soy, including 23 foods, which indicates the presence of soy additives in them. Of the 29 samples, 6 gave a positive reaction to the GTS 40-3-2 transformation event, including 5 soy samples (Kyiv, Cherkasy and Kirovohrad regions) and 1 sample of food product represented by soy protein for foreign athletes. This fact is a direct indication that transgenic (GM) soybeans are grown in these areas.

Nine IRAP-based systems have been developed to effectively detect polymorphic loci between the retrotransposons of different cereals. The genetic diversity of soft wheat and spelled genotypes by IRAP markers was studied and the level of genetic difference between the studied varieties of these species was shown. High PCR efficiency based on primers to the Sukkula retrotransposon was

revealed both when used alone and in combination with primers to the Wilma07 and Nikita retrotransposons in barley genome studies.

It was found that the most effective for the study of genetic diversity of wheat are the developed systems REMAP Sukkula+A17898 and Sukkula+HB10 for which the percentage of detected polymorphism is 50 % and 23.07 %, respectively. A phylogenetic tree was constructed, as a result of which it was established that the samples of 'Yatran 60' and 'Natalka', and 'Slavna' and 'Spasivka' varieties have a similar genotype.

Monomorphic fragments detected by electrophoresis of PCR products in varieties of different cereals, more clearly indicate the common structural and functional organization of their genomes. In this case, each of the studied varieties has its own range of amplified IRAP and REMAP products (fragments), which differs from the others in their number, size and severity. Analysis of the obtained results, presented in the form of dendrograms of genetic similarity coefficients, showed that the studied varieties are characterized by a relatively high level of intervarietal polymorphism.

The chemical mutagenesis of triticale was performed for the selection of plants that carry the zero-allele by the rye gene *Wx*. A molecular study of mutant plants using IRAP markers was performed, which confirmed the changes in the triticale genome under the action of mutagens.

The dominant and codominant molecular genetic systems of DNA markers for the detection of the *Gpc-B1* gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* in soft winter wheat plants and four codominant molecular genetic systems of DNA markers to SSR loci *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, located on chromosome 6 and calculated the frequency of recombination of loci X8, which is $Xgwm508 = 2.94 \pm 1.28 \%$, $Xgwm193 = 3.96 \pm 1.51 \%$, $Xgwm626 = 2.98 \pm 1.29 \%$, $Xgwm219 = 6.77 \pm 2.08 \%$.

Analysis of plants of F_4 and F_5 generations for the content of biologically important elements by ICP-MS revealed that the presence of the *Gpc-B1* gene causes a statistically significant increase in the level of accumulation in grains of

iron, zinc, manganese, copper, selenium and magnesium. A comprehensive analysis of the measurement of total grain protein content in F₅ generation plants by the Kjeldahl and NIR methods showed that the *Gpc-B1* gene causes a 14 % increase in protein content compared to the original 'Kuyalnik' variety. Evaluation of yield and selection indicators of F₆ generation wheat lines, carriers of the *Gpc-B1* gene, revealed their resistance to lodging and average yield at the level of 4.3 t/ha.

In general, comprehensive studies of the genetic effects of the *Gpc-B1* gene introduced from *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, allowed the introduction of technology for the selection of bread winter wheat lines, which have improved grain quality. The applied biotechnology of marker-dependent selection provided the creation of the latest selection material of wheat with high content of protein and useful microelements in grain in combination with high economically valuable properties of plants.

The primers were modeled and their efficiency for determination of transgenic extracopies of alleles of the *Glu-A1* locus by PCR was checked. 44 families of the F₅ generation, carriers of the *Gpc-B1* gene, were evaluated for the presence of allelic subunits of the *Glu-1* genes of reserve proteins. At the three loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, the 16 most valuable families were identified, which have the optimal allelic component of the *Glu-1* locus (*Glu-A1a* or *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*) for baking quality. It is shown that the combination in the descendants of alleles responsible for improving the quality of flour is an important step in creating extra strong varieties of wheat, and the maximum effect of a valuable allele is achieved by the correct selection of the genetic environment.

The allelic composition of the *Pina-D1* and *Pinb-D1* genes, which are responsible for consistency of wheat endosperm, was determined by PCR. In the multivariate analysis of variance of the influence of different alleles of *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* genes and their combinations on the solid-grained type of endosperm of wheat hybrids, a joint effect ($p < 0.01$) of combinations of alleles of *Wx-A1* and *Wx-D1* genes was revealed. In contrast to hybrids, where a strong effect

($p < 0.001$) on the hardness of the presence of certain alleles of the *Pinb-D1* gene was shown, in commercial varieties of Ukrainian selection such an effect was not detected, indicating that the action of the *Pinb-D1* gene is likely depends on the genetic environment.

To detect bread wheat hybrids F_1 and F_2 , a marker system was created and used to determine the transfer of the modified locus *SBEIIa*, which causes an increase in the accumulation of amylose in the grain. Promising samples for involvement in the selection process were selected.

The allelic composition of *Psy1* genes, which are responsible for the accumulation of carotenoids in cereal grains in 162 varieties and hybrids of domestic and foreign wheat, was determined using a system of DNA markers. Among the studied sample, wheat samples were selected in which the highest concentration of carotenoids can be expected: 'Dobrochynna', 'Kosovytsia', 'Odeska 265', 'Bilyava', 'Polba' (Germany), 'Pysanka', 'Panna', 'Lider', 'Odeska 51', 'Selyanka', 'Povaha', 'Lanovy', 'Sputnytsia'.

It has been shown that the use of molecular genetic markers can be effective for the analysis of wheat genomes for the presence of alleles of *PPO* genes responsible for polyphenol oxidase activity.

Selected marker systems (molecular genetic analysis of DNA and electrophoretic determination of proteins) were found to be effective for the identification of wheat-rye translocations 1BL.1RS and 1AL.1RS in winter bread wheat varieties. It is shown that the complex use of two pairs of target primers SCM9 and PAWS5/S6 to genes located in the short arm of chromosome 1R of rye, allows the identification of wheat-rye translocation and confirm the accuracy of the results regardless of the origin of the translocation. Based on cytogenetic analysis, it was found that varieties with wheat-rye translocations are differentiated by the number of anomalies in meiosis.

Valuable source selection material and new varieties-innovations of winter wheat of different directions of use have been created.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Zea mays*, genetic engineering, transgenic plants, monitoring, molecular genetic markers, genes, alleles, mutations, introgression, diversity, 1BL.1RS, 1AL.1RS translocations, varieties-innovations

СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових та іноземних виданнях

1. Lakhneko, O., Danchenko, M., **Morgun, B.**, Kováč, A., Majerová, P. & Škultéty, L., 2020. Comprehensive comparison of clinically relevant grain proteins in modern and traditional bread wheat cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), pp. 3445(1-21). DOI: 10.3390/ijms21103445 (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
2. Рибалка, О.І., Моргун, В.В. та **Моргун, Б.В.**, 2020. Кольорове зерно пшениці і ячменю – нова стратегія селекції зернових культур із високою біологічною цінністю зерна. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(2), с. 95–127. DOI: 10.15407/frg2020.02.095 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
3. Nitovska, I.O., Abraimova, O.Y., Duplij, V.P., Derkach, K.V., Satarova, T.M., Rudas, V.A., Cherchel, V.Yu., Dziubetskyi, B.V. & **Morgun, B.V.**, 2019. Application of beta-glucuronidase transient expression for selection of maize genotypes competent for genetic transformation. *Cytology and Genetics*, 53(6), pp. 451–458. DOI: 10.3103/S0095452719060082. (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
4. **Morgun, B.V.** & Dubrovna, O.V., 2019. IRAP analysis of transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*, 53(5), pp. 384–391. DOI: 10.3103/S0095452719050116. (60 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
5. Рибалка, О.І., Моргун, В.В., **Моргун, Б.В.** та Поліщук, С.С., 2019. Генетичні основи нового напрямку селекції оригінальних за якістю зерна

- класів пшениці (*Triticum aestivum* L.) і тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack). *Фізіологія рослин і генетика*, 51(3), с. 207–240. DOI:10.15407/frg2019.03.207 (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
6. Рибалка, О.І., Швартау, В.В., Поліщук, С.С. та **Моргун, Б.В.**, 2019. Зниження вмісту фітатів як засіб біофортificaції ячменю за мінеральним складом зерна. *Фізіологія рослин і генетика*, 51(2), с. 95–113. DOI: 10.15407/frg2019.02.095 (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 7. Nitovska, I.O., Vasylenko, M.Yu. & **Morgun, B.V.**, 2018. Investigation of monocotyledon introns influence on the expression of transgenes in dicotyledonous plants in the genus *Nicotiana*. *Biotechnology Acta*, 11(4), pp. 73–83. DOI: 10.15407/biotech11.04.073 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 8. Лялько, І.І., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2018. Аналіз мейозу в сортів пшениці озимої м'якої – носіїв пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 16(2), с. 174–182, DOI: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1055 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 9. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Поліщук, С.С., 2018. *Gpc-B1* (NAM-B1) ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка в зерні та мікроелементів. *Фізіологія рослин і генетика*, 50(4), с. 279–298. DOI: 10.15407/frg2018.04.279 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 10. Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2018. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 50(3), с. 187–217. DOI: 10.15407/frg2018.03.187 (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 11. Stepanenko, O.V., Stepanenko, A.I., Kuzminskiy, Ye.V. & **Morgun, B.V.**, 2017. Identification of *Psy1* genes alleles responsible for carotenoid

- accumulation in wheat grains. *Biotechnologia Acta*, 10(2), pp. 57–66. DOI: 10.15407/biotech10.02.057 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
12. Михальська, Л.М., Похилько, С.Ю., Швартау, В.В., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Біологічні студії / Studia Biologica*, 11(3–4), с. 34–35, DOI: 10.30970/sbi.1103.563 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 13. Похилько, С.Ю., Швартау, В.В., Починок, В.М., Михальська, Л.М., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 15(1), с. 52–57. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.15.1.712 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 14. Степаненко, О.В., Музафарова, В.А., Степаненко, А.І., Кузьмінський, Є.В., Рябчун, В.К. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Комплексна молекулярно-генетична оцінка генофонду ячменю ярого за напрямками використання. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(4), с. 328–338. DOI: 10.15407/frg2017.04.328 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 15. **Моргун, Б.В.**, Похилько, С.Ю., Починок, В.М., Дуплій, В.П., Дуган, О.М., Христан, О.О. та Степаненко, А.І., 2017. Генетичне різноманіття пуринодолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* із *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(3), с. 229–236. DOI: 10.15407/frg2017.03.229 (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
 16. Похилько, С.Ю., Степаненко, А.І., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 21, с. 168–173. DOI: 10.7124/FEEO.v21.829 (30 %

авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

17. Нітовська, І.О., Комарницький, І.К. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Селекція на гліфосаті трансгенних калюсних ліній кукурудзи генотипів, районованих в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 20, с. 237–242. DOI: 10.7124/FEEO.v20.771 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
18. Степаненко, Е.В., Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.**, Рыбалка, А.И. и Кузьминский, Е.В., 2016. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. *Вестник «ЮКГФА» (Республиканский научный журнал «Вестник Южно-Казахстанской государственной фармацевтической академии»*. Республика Казахстан, г. Шымкент. 4(77), с. 29–31. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
19. Lakhneko, O.R., **Morgun, B.V.**, Kalendar, R.M., Stepanenko, A.I., Troianovska, A.V. & Rybalka, O.I., 2016. SSR analysis in the study of genetic diversity and similarity of barley cultivars. *Biotechnologia Acta*, 9(3), pp. 61–68. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.061> (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
20. Pokhyloko, S.Yu., Schwartau, V.V., Mykhalska, L.M., Dugan, O.M. & **Morgun, B.V.**, 2016. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Biotechnologia Acta*, 9(5), pp. 64–69. DOI: 10.15407/biotech9.05.064 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
21. **Моргун, Б.В.**, 2016. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(4), с. 324–343. DOI: 10.15407/frg2016.04.324
22. Моргун, В.В., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(3), с. 196–214. DOI: 10.15407/frg2016.03.196 (30 % авторства: , аналіз результатів, написання статті).

23. Горбатюк, І.Р., Щербак, Н.Л., Банникова, М.О., Великожон, Л.Г., Кучук, М.В. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(1), с. 65–74. DOI: 10.15407/frg2016.01.065 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
24. **Моргун, Б.В.**, Лялько, І.І., Степаненко, А.І., Бавол, А.В. та Великожон, Л.Г., 2016. Цитологічна та молекулярно-генетична характеристика сортів озимої м'якої пшениці, отриманих за інтрогресивної селекції та мутагенезу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, с. 167–171. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
25. Похилько, С.Ю., Трояновська, А.В., Степаненко, А.І., Урбанович, О.Ю., Дуган, О.М., Рибалка, О.І. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 18, с. 132–136. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
26. Polishchuk, S.S., Kyrdohlo, E.K., Mykhalska, L.M., **Morgun, B.V.**, Pokhylko, S.Yu., Rybalka, O.I. & Schwartau, V.V., 2016. Quantification of trace elements Fe, Zn, Mn, Se in barley grain. *Agricultural Science and Practice*, 3(1), pp. 49–54. <https://doi.org/10.15407/agrisp3.01.049> (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
27. Gorbatyuk, I.R., Baval, A.V., Holubenko, A.V. & **Morgun, B.V.**, 2015. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka. *Biotechnologia Acta*, 8(1), pp. 56–62. doi: 10.15407/biotech8.01.056 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
28. Taranenko, A.M., Sakhno, L.O., **Morgun, B.V.** & Kuchuk M.V., 2015. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants. *Biotechnologia Acta*, 8(2), pp.

- 52–57. doi: 10.15407/biotech8.02.052 (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
29. Горбатюк, І.Р., Бавол, А.В., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого сорту Подолянка. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*, 24(1153), с. 47–53. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
30. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Тараненко, А.М., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(6), с. 514–525. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
31. Тищенко, Е.Н. и **Моргун, Б.В.**, 2015. Генетическая инженерия по повышению осмотолерантности культурных злаковых растений с использованием генов транскрипционных факторов DREB и AREB/ABF. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(5), с. 371–392. (40 % авторства: аналіз результатів, написання статті).
32. Рибалка, О.І., Моргун, В.В., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2015. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(2), с. 95–111. (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
33. **Моргун, Б.В.**, Степаненко, О.В., Степаненко, А.І. та Рибалка, О.І., 2015. Молекулярно-генетична ідентифікація поліморфізму генів Wx у гібридах м'якої пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(1), с. 25–35. (60 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
34. Степаненко, А.І., Степаненко, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Поліморфізм генів пшениці, які визначають якісні ознаки, у харчових продуктах. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 16, с. 161–165. (40 %

авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

35. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Позитивний вплив антибіотика тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 17, с. 136–140. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
36. **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Лялько, І.І., Великожон, Л.Г. та Степаненко, А.І., 2014. Молекулярно-генетична ідентифікація та цитологічні особливості сортів озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 15, с. 220–223. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
37. Степаненко, А.І., Благодарова, О.М., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В. та Рибалка, О.І., 2014. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 12(1), с. 78–83. (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
38. Степаненко, А.І., Трояновська, А.В., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Великожон, Л.Г., Рибалка, О.І. та Поліщук, С.С., 2014. Маркерний аналіз генів поліфенолоксидази (РРО) у сортах м'якої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(6), с. 490–497. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
39. **Моргун, Б.В.**, Степаненко, А.І., Чугункова, Т.В., Лялько, І.І., Степаненко, О.В. та Великожон, Л.Г., 2014. Молекулярне визначення локалізації житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(4), с. 319–324. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

40. Степаненко, О.В., **Моргун, Б.В.**, Рибалка, О.І., Степаненко, А.І. та Кузьмінський, Є.В., 2014. Виявлення алельних варіантів гена *wax* серед вітчизняних і зарубіжних сортів ячменю. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*, 3(95), с. 78–83. (25 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
41. Топчій, Т.В., Починок, В.М. та **Моргун, Б.В.**, 2014. Стійкість ліній озимої пшениці, створених способом віддаленої гібридизації, до комплексу хвороб та шкідників. *Фізіологія рослин і генетика*, 46(3), с. 230–235. (25 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
42. Бавол, А.В., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Одержання та аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці. *Biotechnologia Acta*, 6(6), с. 113–119. (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
43. Makarenko, R., Savchuk, O., Rumianceva, A., Ivashchuk, B., Cherep, M., Gorobec, S. & **Morgun, B.**, 2013. Cloning and molecular-genetic analysis *Deschampsia antarctica* mitochondrial sequences. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*, 2(64), pp. 45–47. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
44. Марковський, О.В., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Виявлення *cru* генів, які детермінують стійкість до комах, за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції у трансгенної кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 12, с. 276–280. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
45. **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Рибалка, О.І., Починок, В.М., Тарасюк, О.І. та Степаненко, А.І., 2013. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(4), с. 290–295. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

- 46.Рибалка, О. І., Поліщук, С. С., Кірдогло, Є. К. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів голозерного ячменю харчового напрямку. *Физиология и биохимия культурных растений*, 45(3), с. 187–205. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
- 47.Рибалка, О.І., Червоніс, М.В., **Моргун, Б.В.**, Починок, В.М. та Поліщук, С.С., 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку технологічного використання зерна. *Физиология и биохимия культурных растений*, 45(1), с. 3–19. (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
- 48.Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2012. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків. *Физиология и биохимия культурных растений*, 44(1), с. 3–22. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
- 49.Степаненко, А.І., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Адаменко, Н.І. та Великожон, Л.Г., 2012. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 10(2), с. 311–318. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).
- 50.Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2011. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів. *Физиология и биохимия культурных растений*, 43(6), с. 463–477. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, обробка літератури, аналіз результатів, написання статті).
- 51.Ларченко, К.А. та **Моргун, Б.В.**, 2010. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення. *Физиология и биохимия культурных растений*, 42(6), с. 463–474. (40 % авторства: опрацювання літератури, аналіз результатів, написання статті).

52. Матвеева, А.Ю., Корж, Л.П., Христан, О.О., **Моргун, Б.В.** и Тищенко, Е.Н., 2010. Анализ компетенции *Agrobacterium*-опосредованной трансформации морфогенного каллуса инбредных линий кукурузы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 9, с. 308–313. (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
53. Villani, M.E., **Morgun, B.**, Brunetti, P., Marusic, C., Lombardi, R., Pisoni, I., Bacci, C., Desiderio, A., Benvenuto, E. & Donini, M., 2009. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), pp. 59–72. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00371> (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
54. Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2009. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Физиология и биохимия культурных растений*, 41(6), с. 463–475. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

Монографії

1. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Поліщук С.С. *Ячмінь як продукт функціонального харчування*. К.: Логос, 2016. – 670 с. ISBN 978-617-7442-06-5 (40 % авторства: аналіз результатів, написання 4, 9–12 розділів).
2. **Моргун Б.В.**, Тищенко Е.Н. *Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам*. К.: Логос, 2014. – 221 с. ISBN 978-966-171-887-5 (60 % авторства: узагальнення матеріалів та укладання, написання монографії).
3. Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, Бавол А.В. *Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія*. К.: Логос, 2014. – 375 с. ISBN 978-966-171-883-7 (30 % авторства: узагальнення матеріалів та укладання, написання монографії).

Патенти на винахід та корисні моделі

1. Патент України на винахід № 117974. Спосіб трансформації та селекції кукурудзи / Абраїмова О.Є., Нітовська І.О., **Моргун Б.В.**, Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Деркач К.В., Сатарова Т.М. / Заявники та патентовласники Державна установа Інститут зернових культур НААН України й Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Бюл. № 20, 2018 р. (20 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).
2. Патент України на корисну модель № 115633. Спосіб отримання трансформованих рослин м'якої пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур апікального походження / Волч І.Р., Банникова М.О., Гнатюк І.С., **Моргун Б.В.** Заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. 19.10.2016. (30 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).
3. Патент України на корисну модель № 104264. Сніданок академіка Рибалки. / Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М. заявник та патентовласник Інститут фізіології рослин та генетики НАН України. Опубліковано: 25.01.2016, Бюл. № 2. (30 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).
4. Патент України на корисну модель № 77331. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* / Матвеєва О.Ю., Тищенко О.М., **Моргун Б.В.** Власник Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. Бюл. № 3, 2013 (30 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).
5. Патент України на корисну модель № 77768. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи NK603 в генетично модифікованій

рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4. (40 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).

6. Патент України на корисну модель № 77769. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи MON810 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4. (40 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).
7. Патент України на корисну модель № 61602 Спосіб визначення трансгенної лінії GA21 кукурудзи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Банникова М.О., Сатарова Т.М., Борисова В.В., Кучук М.В. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.07.2011, Бюл. № 14. (40 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).

Авторські свідоцтва на сорти рослин

1. А.с. № 120154 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Сотниця**. Автори: Артемчук І.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Братущак С.П., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 423. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
2. А.с. № 120157 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Орійка**. Автори: Артемчук І.П., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Братущак С.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). Опубліковано в Бюлетні

- «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 417. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
3. А.с. № 140640 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Придніпровська**. Автори: Братущак С.П., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Долежан Я. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 242. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
 4. А.с. № 140639 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Астарта**. Автори: **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 12. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
 5. А.с. № 141024 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Покрова**. Автори: **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 254. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
 6. А.с. № 141023 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Софія Київська**. Автори: **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 260. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
 7. А.с. № 141028 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Здоба Київська**. Автори: **Моргун Б.В.**, Оксьом Л.Л., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 236. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
 8. А.с. № 141112 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Коляда**. Автори: Артемчук І.П., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2015. С. 374. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
 9. А.с. № 160548 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Золото України**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., **Моргун Б.В.** (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 502. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

10. А.с. № 160512 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Новосмуглянка**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., Оксьом Л.Л., **Моргун Б.В.** (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 504. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
11. А.с. № 160543 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Соломія**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 511. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
12. А.с. № 170768 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Бужанка**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Катеринчук О.М., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 371. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
13. А.с. № 170769 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Бондарівна**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 370. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
14. А.с. № 170770 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Зореслава**. Автори : Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 385. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).
15. А.с. № 171137 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Стрітенська**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 343. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
16. А.с. № 180225 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світогляд**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 341. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

17. А.с. № 171142 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Городниця**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.** (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 325. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
18. А.с. № 171140 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Перлина Поділля**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.** (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 335. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
19. А.с. № 171138 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Боровиця**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 321. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
20. А.с. № 180874 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світоч**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 485. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
21. А.с. № 180873 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Порадниця**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 479. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
22. А.с. № 200479 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Січеслава**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 101. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
23. А.с. № 200483 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Плеяда**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Гаврилюк М.М. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 100. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
24. А.с. № 200488 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Донор Київський**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Починок

- В.М. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 104. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
25. А.с. № 200482 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Аміна**. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., **Моргун Б.В.**, Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 92. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
 26. А.с. № 200481 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Джамала**. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., **Моргун Б.В.**, Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 94. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).
 27. А.с. № 200788 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Академічна 100**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 250. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
 28. А.с. № 200790 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Ювілейна Патона**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 295. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
 29. А.с. № 200789 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світязь**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 286. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
 30. А.с. № 72491 Російської Федерації. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Астарта**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Скрипльов В.О. (Російська Федерація). Зареєстровано в Державному реєстрі охоронних селекційних досягнень Російської Федерації, 2018. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).
 31. А.с. № 730(3) Республіки Молдова. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Сотниця**. Автори: Моргун В.В., Артемчук І.П., Братущак С.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Республіка Молдова). Оpubліковано

Soiul este inclus in Catalogul Soiurilor de Plante al Republicii Moldova in anul 2018. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

Основні тези наукових конференцій

1. Гав'яз В.О., Салашний Т.А., Великожон Л.Г., **Моргун Б.В.** Генотипування синтетичних ліній пшениці за генами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* запасних білків глютенінів. XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «*Біотехнологія XXI століття*» присвячена 135-річчю від дня народження О. Палладіна 20.05.2020, Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського. С. 22.
2. Chen G., Michael T., Stepanenko A., Zhou Yu., Peterson A., Kishchenko O., Cui D., Zhu H., Lakhneko O., **Morgun B.**, Lam E., Borisjuk N. Special arrangement of 5S rDNA in great duckweed, *Spirodela polyrhiza*: unusually low gene copy number, sequence divergence and precise chromosomal arrangement. *5th International ICDRA Conference on Duckweed Research and Applications*. Weizmann Inst. of Science. Rehovot, Israel. 9-12.09.2019. P. 59.
3. Chen G., Michael T., Zhou Yu., Stepanenko A., Peterson A., Kishchenko O., Lakhneko O., **Morgun B.**, Lam E., Borisjuk N. Duckweed rDNA organization and evolution. *PAG XXVII - Plant & Animal Genome Conference*. San Diego, USA, January 2019. P. 232.
4. Borisjuk N., Shi J., Bi H., Peterson A., Chen C., Shavrukov Y., Stepanenko A., **Morgun B.**, Utebayev M., Hrmova M., Lopato S. Diversity of grain and leaf surface aliphatic components in wheat. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018. P.25.
5. Lakhneko O., **Morgun B.**, Skultety L., Danchenko M. Comparative proteomics of grain allergens from several wheat varieties. *The 3rd Int. Plant Proteomic Org. (INPPO) World Congress*, Padova, Italy, 9–12.09.2018. P. 62.
6. Lakhneko O., Stepanenko A., Borysyuk M., Stasik O., Kuzminskiy Ye., **Morgun B.** Sequence diversity of the gene coding for drought related transcription factor WRKY in selected Ukrainian wheat cultivars. *The 4th Symp. on EuroAsian Biodiversity*, Kyiv, Ukraine, 03–06.07.2018, C. 395.

7. Lakhneko O., Stepanenko A., Borysyuk M., Stasik O., **Morgun B.** Sequence polymorphism of the gene coding for drought related wheat transcription factor WRKY2. *Resurrection plants: Hope for crop drought tolerance (ReHOPE)*, University of Plovdiv, Bulgaria, September 20-22, 2018, P. 45.
8. Stepanenko A., Lakhneko O., **Morgun B.**, Borisjuk N. Isolation and characterization of rye *SbeIIa* and *SbeIIb* genes. *The 3rd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences*, Fuzhou, China, 15–18.12.2018, P. 37.
9. Zhou Y., Chen C., Peterson A., Stepanenko A., Kishchenko O., Lakhneko O., **Morgun B.**, Borisjuk N. Comparative biodiversity of duckweeds in Central Ukraine and Eastern China and their potential for remediation of wastewater. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, 03–06.07.2018. P. 108.
10. Pokhylko S., Schwartau V., Pochinok V., Mykhalska L., Dugan O., **Morgun B.** Influence of *Gpc-B1* of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* on grain protein content in bread wheat. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*, 05–08 July 2017, Minsk, Belarus, 2017, P. 417.
11. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Трояновська Л.В., Жалій Н.А., Банникова М.О., **Моргун Б.В.** Визначення наявності та експресії трансгенів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *Triticum aestivum* L. сортів Подолянка та Зимоярка. *Biotechnology for Agriculture and Environmental Protection: XII International Scientific-Applied Conference*. Odesa, Ukraine, September 7–10, 2016, P. 74–77.
12. Степаненко Е.В., Степаненко А.И., **Моргун Б.В.**, Рыбалка А.И., Кузьминский Е.В. Маркер-опосредованная селекция Wх-тритикале. *IV международная научная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации»*, 9–10 ноября 2016 года (г. Шымкент, Республика Казахстан). С. 134–135.
13. Abraimova, O.E., Satarova, T.M., **Morgun, B.V.**, Nitovska I.O., Derkach, K.V., Cherenkov, A.V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. *The 57th Annual Maize Genetics Conference*, March 12–15, 2015, St. Charles, Illinois, USA, P. 140.

14. Nitovska I., Komarnytsky I., Abraimova O., Satarova T., **Morgun B.** *Agrobacterium*-mediated transformation of maize of Ukrainian breeding genotypes. *International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology*, Lviv, Ukraine, October 11–13, 2015, P. 44.
15. Трояновская А.В., Похилько С.Ю., **Моргун Б.В.**, Степаненко А.И., Рыбалка А.И., Полищук С.С., Починок В.М. Определение ценных алелей гена *Grc-B1* в генотипах мягкой пшеницы. *II международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы»*, г. Минск, 13–16 октября 2015 года. С. 128.
16. Макаренко Р.А., **Моргун Б.В.** Клонирование и биоинформатический анализ последовательностей кДНК генов SHP малых гидрофобных белков антарктических мхов. *Вторая летняя школа по биоинформатике*, Санкт-Петербург, 27 июля – 1 августа 2014 года. С. 33–34.
17. Нитовская И.А., Абраимова О.Е., Сатарова Т.Н., **Моргун Б.В.** Морфология растений кукурузы, выращенных в условиях теплицы, после регенерации *in vitro*. *VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира»*, Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Украина, 12–17.10.2014. С. 44.
18. Степаненко А.И., **Моргун Б.В.**, Рыбалка А.И. Молекулярные маркеры для детектирования в пшенице QTL *Grc-B1*, перенесенного от *T. dicoccoides*. *XIV Молодёжная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»*, Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 16 апреля 2014 года, С. 50–52.
19. Степаненко О.В., Рыбалка О.І., Степаненко А.І., **Моргун Б.В.** Розробка низхідної ПЛР для визначення алельних варіантів гену *Wax* ячменю. *Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених «Проблеми и перспективы исследований растительного мира»*, Нікітський бот. сад ННЦ НААН України, Ялта, Україна, 13–16.05.2014, С. 67–68.

20. Makarenko R.O., Savchuk O.P., Cherep M.N., **Morgun B.V.** Cloning and molecular genetic analyses of *Deschampsia antarctica* mitochondrial DNA sequences. *Cell Technology Week*. Kyiv, Ukraine, 14–17 May 2013, P. 52.
21. **Моргун Б.В.** Молекулярні маркери як засіб вільного вибору. *The 1st International Online Conference on “Plant Genomics and Biotechnology”*, ІХБіГ НАН України, Київ, Україна, 23 грудня 2013 року, С. 21.
22. Fedorenko, T., Markovskiy, O., Vlasova, O., Bannikova, M., Kuchuk, M., **Morgun, B.** Detection of resistant to glyphosate maize transformation events GA21, MON88017 and NK603 among Ukrainian market samples. *World Congress on In Vitro Biology*, Washington, USA, June 3–7, 2012, P-2057.
23. Степаненко А.И., **Моргун Б.В.**, Починок В.М. Скрининг селекционных образцов пшеницы на наличие аллеля *al* локуса *Glu-B1*. *XII Молодёжная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии»*, Москва, РФ, Всероссийский научно-исслед. институт сельскохозяйственной биотех., 11.04.2012, С. 64–65.
24. Михальская Л.Н., **Моргун Б.В.**, Швартау В.В., Волков К.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Ионномика – инновационный комплексный подход к изучению ионного гомеостаза. *Всероссийский симпозиум «Растение и стресс»*, 9–12 ноября 2010 года, Москва, РФ, С. 244–245.
25. Опанасенко Т.Г., Смірнова О.М., Порецька О.І., Жолнер Л.Г., Рудас В.А., **Моргун Б.В.**, Кучук М.В. Моніторинг насіння кукурудзи зібраного в Україні на присутність трансформаційної події MON810. *Друга міжнародна наукова конференція «Генетично модифіковані (біотехнологічні) рослини: перспективи використання та проблеми біобезпеки»*, 6-8 жовтня 2009 р., Київ, Україна. С. 94.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	43
ВСТУП	47
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	61
1.1. Сучасний стан та основні напрями генетичного поліпшення рослин ..	61
1.2. Біотехнологічні методи створення нового покоління сортів злакових культур	66
1.2.1. Генетична трансформація злаків	68
1.2.1.1. Генетична трансформація кукурудзи	75
1.2.1.2. Генетична трансформація пшениці	80
1.3. Використання ДНК-маркерів у селекції рослин	93
1.3.1. IRAP-маркери для генотипування сільськогосподарських культур ..	93
1.3.2. Застосування ДНК-маркерів у практичній селекції	99
1.4. Генетичні системи, які контролюють якість зерна м'якої пшениці ...	105
1.5. Пшенично-житні транслокації	113
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	126
2.1. Матеріал досліджень	126
2.2. Біотехнологічні методи	129
2.2.1. Одержання первинної калюсної культури пшениці та умови культивування	129
2.2.2. Визначення впливу синтетичних регуляторів росту на частоту регенерації з калюсу пшениці м'якої	131
2.2.3. Генетичні вектори та агробактеріальні штами, використані в дослідженнях	132
2.2.4. Визначення інгібуючого впливу антибіотиків на клітини <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	133
2.2.5. Визначення впливу антибіотика тиментину на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів	134

2.2.6. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація пшениці в умовах <i>in vitro</i>	134
2.2.7. Генетична трансформація пшениці методом <i>in planta</i>	135
2.2.8. Молекулярно-генетичний аналіз трансформованих рослин	136
2.2.9. Генетична трансформація кукурудзи	137
2.3. Молекулярно-генетичні методи	139
2.3.1. Виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу	139
2.3.1.1. Виділення загальної ДНК ЦТАБ методом	140
2.3.1.2. Виділення загальної ДНК ЦТАБ-експрес методом	141
2.3.2. Спектрофотометричне вимірювання загальної рослинної ДНК	142
2.3.3. Праймери, які застосовувалися у дослідженні	142
2.3.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції	146
2.3.5. Визначення господарсько-корисних генів	149
2.3.6. Визначення пшенично-житніх траслокацій	152
2.3.7. Проведення електрофорезу ДНК у агарозному гелі	155
2.3.8. Аналіз глютенінової фракції запасних білків пшениці методом електрофорезу у поліакриламідному гелі	156
2.3.9. Аналіз гліадинової фракції запасних білків пшениці методом електрофорезу у поліакриламідному гелі	157
2.3.10. Метод визначення активності поліфенолоксидаз	157
2.4. Статистичний аналіз результатів	158
РОЗДІЛ 3. ПРИНЦИПИ КОНСТРУЮВАННЯ ВЕКТОРІВ ТА ДОБІР ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН	159
3.1. Вивчення послідовності гена <i>SHP1</i> у мохів Антарктики	160
3.2. Клонування і молекулярно-генетична характеристика послідовностей ДНК мітохондрій <i>Deschampsia antarctica</i>	176
РОЗДІЛ 4. АГРОБАКТЕРІУМ-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ	194

4.1. Оптимізація умов <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі <i>in vitro</i>	196
4.1.1. Застосування антибіотика β -lactam групи тиментину для елімінації <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	202
4.2. Розробка протоколу <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі <i>in vitro</i>	209
4.3. Отримання трансгенних рослин пшениці м'якої, стійких до фосфінотрицину (гербіцид Баста)	216
4.4. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація пшениці м'якої методом <i>in planta</i>	220
4.4.1. Оптимізація методики <i>Agrobacterium</i> -опосередкованої трансформації <i>in planta</i> пшениці <i>T. aestivum</i> сорту 'Подільянка'	221
4.5. Отримання біотехнологічних рослин пшениці м'якої сорту 'Подільянка', стійких до фосфінотрицину, методом <i>in planta</i>	225
4.6. Дослідження експресії трансгенів у рослинах пшениці <i>T. aestivum</i> ...	229
4.7. Аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній та рослин-регенерантів м'якої пшениці	232
4.7.1. Отримання та аналіз методом IRAP-ПЛР трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці	234
4.7.2. IRAP-аналіз трансгенних рослин-регенерантів пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази	239
РОЗДІЛ 5. ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КУКУРУДЗИ	
IN VITRO	251
5.1. Отримання та аналіз трансгенних рослин-регенерантів кукурудзи, що містять ген <i>cp4 epsps</i>	252
5.1.1. Регенераційна здатність калюсу кукурудзи тривалого культивування	253
5.1.2. Використання гліфосату в якості селективного агента	254
5.1.3. Вплив селективних агентів на регенераційну здатність калюсу кукурудзи гібрида R ₂ PLS61×PLS61	256

5.2. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація морфогенного калюсу кукурудзи гібрида R ₂ PLS61×PLS61	258
5.2.1. Аналіз ДНК регенерантів на присутність трансгенів	260
5.2.2. <i>Agrobacterium</i> -опосередкована трансформація морфогенного калюсу векторами p12 та p13	263
5.2.2.1. Вплив оптичної щільності суспензії клітин агробактерії на частоту регенерації пагонів	266
5.2.3. Аналіз ДНК тепличних рослин-регенерантів	267
5.3. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи	268
5.4. Морфобіологічні особливості трансформантів кукурудзи в поколіннях T ₀ -T ₆	274
РОЗДІЛ 6. МОНІТОРИНГ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН НА ПОЛЯХ ТА У ТОРГІВЕЛЬНІЙ МЕРЕЖІ	285
6.1. Виявлення трансгенної кукурудзи	286
6.1.1. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційної події MON810	287
6.1.2. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій GA21 та NK603	291
6.1.3. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність занесених трансгенних форм	297
6.1.4. Розробка мультиплексної реакції для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією гена зеїну кукурудзи	300
6.1.5. Розробка мультиплексної реакції для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603	303
6.2. Ідентифікація трансгенного статусу гербіцидостійкого ріпаку на території Київської області	305
6.3. Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах	309
6.3.1. Детекція послідовності <i>nos</i> -термінатора в зібраних зразках	312
6.3.2. Визначення трансформаційної події GTS 40-3-2	313

6.3.3. Розробка мультиплексної реакції для виявлення трансформаційної події GTS 40-3-2 та референтного гена <i>lectin</i>	314

РОЗДІЛ 7. ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ У СЕЛЕКЦІЇ ЗЛАКІВ

7.1. Розробка систем маркерів на основі ретротранспозонів для оцінки генетичного поліморфізму злакових культур	323
7.1.1. Дослідження генетичного різноманіття сортів <i>Triticum aestivum</i> за допомогою IRAP-маркерів	323
7.1.2. Дослідження генетичного різноманіття <i>T. spelta</i> за допомогою IRAP-маркерів	326
7.1.3. Дослідження генетичного різноманіття сортів <i>H. vulgare</i> за допомогою IRAP-маркерів	330
7.1.4. Дослідження мутантних ліній тритикале з використанням IRAP-маркерів	332
7.1.5. Визначення поліморфізму ДНК різних сортів пшениці з використанням REMAP-маркерів	334
7.2. Системи ДНК-маркерів для генотипування пшениці	339
7.2.1. Розробка способів маркування функціонального алеля <i>Gpc-B1</i>	339
7.2.2. Аналіз мінерального і білкового складу сімей F ₅ – носіїв гена <i>Gpc-B1</i>	348
7.3. Вивчення алельних варіантів локусів запасних білків пшениці	354
7.3.1. Розробка підходів до детектування трансгенних екстракопій алелів локусу <i>Glu-A1</i>	354
7.3.2. Аналіз алельного складу генів <i>Glu-1</i> системою молекулярно-генетичних маркерів у сім'ях– носіях гена <i>Gpc-B1</i>	356
7.4. Визначення алельного поліморфізму генів, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці	361
7.4.1. Виявлення алелів генів <i>Pina-D1</i> та <i>Pinb-D1</i> , які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці	361
7.4.2. Дослідження алельного складу пуринодолінових генів у сім'ях пшениці	

м'якої – носіях гена <i>Gpc-B1</i>	363
7.4.3. Вплив різних алелів гена <i>Pinb-D1</i> на технологічні показники зерна і консистенцію ендосперму зернівки пшениці комерційних сортів	366
7.5. Вивчення генів, які детермінують склад крохмалю в ендоспермі зернівок	372
7.6. Ідентифікація алелів генів <i>Psy</i> пшениці м'якої, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні	375
7.7. Розробка системи ДНК-маркерів для виявлення алелів генів пшениці, які зумовлюють активність поліфенолоксидазних ферментів	382
7.8. Розробка системи ДНК-маркерів для ідентифікації центричних пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS, 1AL.1RS та 1BL.RSm	388
7.8.1. Дослідження мейозу у сортів пшениці для визначення пшенично- житньої транслокації	398
РОЗДІЛ 8. ПРИКЛАДНІ РЕЗУЛЬТАТИ СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ТА СОРТІВ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР	411
УЗАГАЛЬНЕННЯ	436
ВИСНОВКИ	448
СПИСОК ПОСИЛАНЬ	454
ДОДАТКИ	493

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

1AL.1RS, 1BL.1RS	– пшенично-житні транслокації
2,4-Д	– 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота
AA	– акриламід
<i>bar</i>	– ген стійкості до біалафосу
DBE	– debranching enzymes, ферменти дерозгалуження ланцюга крохмалю
<i>epsps</i>	ген енолпіруватшкіматфосфатсинтази
GBSSI (ground bound starch synthase I)	– ген у геномі жита, який відповідає за синтез амілози; Wx-протеїн, асоційований з гранулами синтезу крохмалю
GIMP	– GNU Image Manipulation Program, растровий графічний редактор
<i>Gli</i>	– локус, що кодує спирторозчинні білки гліадини;
<i>Glu-A1, Glu-D1</i>	– генетична система, яка контролює хлібопекарську якість м'якої пшениці <i>Triticum aestivum</i> L.
<i>Gpc-B1</i>	– ген, пов'язаний з підвищенням вмісту білка та мікроелементів у зерні пшениці
<i>Ha</i>	– Hardness, генетичний локус, який детермінує консистенцію ендосперму зернівки
ICP-MS	– inductively coupled plasma mass spectrometry, метод мас-спектрометрії з індукційно зв'язаною плазмою
IRAP	– inter-retrotransposon amplified polymorphism, мультилокусні маркери, базуються на ампліфікації геномної ДНК між прилеглими послідовностями ретротранспозонів

ISSR	– inter simple sequence repeat, ампліфікація ділянок ДНК між мікросателітними послідовностями
LTR	– довгі термінальні повтори на кінцях ретротранспозонів
MAR	– matrix-attachment region, ділянка ДНК, пов'язана з геном <i>Glu-B1a1</i>
MAS-селекція	– marker-assisted selection, маркер-асоційована селекція, базується на аналізі ДНК
MS	– середовище Murasige і Скуга
NIR, NIRS	– near infrared spectrometry, інфрачервона спектроскопія;
<i>nptII</i>	– ген неоміцинофосфотрансферази II
<i>Pina-D1, Pinb-D1, Gsp-1</i>	– гени локусу <i>Ha</i> , які кодують білок фріабілін, що складається з 3-х поліпептидів – пуриноліну а (ген <i>Pina-D1</i>), пуриноліну b (ген <i>Pinb-D1</i>) та Grain Softness Protein (ген <i>Gsp-1</i>)
PSI	– particle size index, метод визначення індексу розміру часток
Psy	– фітоінсинтаза, ключовий фермент біосинтезу каротиноїдів
RBIP	– retrotransposon-based insertion polymorphisms, маркери, які дозволяють визначити наявність ретротранспозонних вставок у конкретному локусі
REMAP	– retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism, ампліфікується ділянка між прилеглими послідовностями ретротранспозону і мікросателіту
SBE	– starch branching enzyme, ензим (1,4-alpha-glucan 6-alpha-glucosyltransferase; EC 2.4.1.24)
SBEI, SBEIIa, SBEIIb	– ізоферменти розгалуження ланцюга крохмалю, трансглікозилазні ензими
SDS	– sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрію

SNP	– single nucleotide polymorphism, однонуклеотидний поліморфізм
SSAP	– sequence specific amplification polymorphism, мультилокусні маркери, орієнтовані на аналіз фрагментів ДНК з не ідентифікованою локалізацією в геномі
SSI, SSII, SSIII	– гени, що кодують ферменти-синтетази крохмалю, визначають синтез амілопектину
SSR	– simple sequence repeat, поодинокі специфічні локуси з відомим місцем розташування у геномі
TaTM20	– референтний ген <i>Triticum aestivum</i> ;
UPGMA	– метод побудови філогенетичного дерева родинних зв'язків досліджуваних зразків
Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1	– waxy гени пшениці, мутація за якими призводить до зниженого синтезу амілози
Xgwm193, Xgwm219, Xgwm508, Xgwm626	– локуси мікросателітних послідовностей
БАА	– N,N'- метиленбісакриламід;
БАП	– 6-бензиламінопурин
ВМГ	– високомолекулярні глютеніни;
ВМЦК	– вірус мозаїки цвітної капусти
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДСН	– додецилсульфат натрію
ДСН ПААГ, SDS-PAGE	– метод електрофорезу білків у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію
ЕДТА	– етилендіамінтетраоцтова кислота
Зеа	– зеатин

ЗТ-ПЛР	— полімеразна ланцюгова реакція, поєднана зі зворотною транскрипцією
ІОК	— індоліл-3-оцтова кислота
кДНК	— комплементарна ДНК, не містить інтронів, відповідає мРНК
Кін	— кінетин
об/хв	— оберти на хвилину;
п.н., пн	— пари нуклеотидів
ПААГ	— поліакриламідний гель
ПАГ	— поліакриламідний гель;
ПЕГ	— поліетиленгліколь
ПЛР	— полімеразна ланцюгова реакція
ПСА	— персульфат амонію, застосовується як ініціатор процесу полімеризації під час приготування гелю
РРТ	— фосфінотрицин
Трис	— Трис(гідроксиметил)амінометан
ФМ, функціональні маркери	— розробляються на основі нуклеотидних послідовностей гена, дозволяють виявляти дану послідовність в геномі та розрізняти її алельні варіанти, базуються на поліморфних послідовностях і дозволяють контролювати фенотиповий прояв ознаки;
ЦТАБ	— цетилтриметиламоній бромід

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми досліджень. Генетичне поліпшення рослин і створення сортів нового покоління – один із головних засобів прогресу в сучасному рослинництві. Головним його завданням на даний час є створення сортів і гібридів з високим генетично детермінованим потенціалом продуктивності та якості, стабільною стійкістю до хвороб, шкідників, дії несприятливих чинників навколишнього середовища. Успішне вирішення цього завдання пов'язане з постійним удосконаленням селекційного процесу, його інтенсифікацією через розширення генетичного різноманіття і впровадження в селекційний процес новітніх досягнень геноміки, протеоміки і метаболоміки, технологій цілеспрямованих мутацій, генетичної інженерії та редагування геномів, різних систем молекулярних маркерів (Hsu et al., 2014; Моргун, Рибалка, 2017).

В Україні злакові культури (пшениця, кукурудза, ячмінь) є стратегічним продуктом, оскільки більш як половина населення країни отримує 80 % вуглеводів виключно з хлібних і круп'яних продуктів. Нарощування виробництва високоякісного зерна – основа для розвитку харчової та переробної промисловості, а також підвищення експортного потенціалу країни (Моргун, 2015). Переважна більшість сортів та гібридів злакових культур створена традиційними методами селекції, на основі використання генетичного різноманіття вихідних видів. У сучасних умовах традиційні методи селекції, що ґрунтуються на тривалих емпіричних дослідженнях, комбінативній мінливості та схрещуваннях з носіями бажаних генів, не можуть повною мірою задовольнити потреби селекціонерів. Тому дедалі більшого значення набуває впровадження досягнень біотехнології в генетико-селекційний процес. Це насамперед – розроблення нових технологій селекційного процесу на основі вдалого поєднання класичних методів селекції і досягнень генної інженерії та маркер-допоміжної селекції (Hiei et al., 2014; Jasdeep and Avijit, 2015; Anwar et al., 2018; Adel et al., 2021).

Останніми десятиріччями значно поширилися дослідження з використанням методів генетичної інженерії для створення модифікованих рослин злакових культур (Решетников и др., 2014; Borisjuk et al., 2019; Anwar et al., 2020). Слід зазначити, що родина Злаків є найбільш господарсько важливою і водночас дуже складною для застосування генно-інженерних технологій. Незважаючи на досягнуті успіхи, перспективи реального покращення злаків засобами генетичної інженерії поки обмежені через складність функціонування і недостатню вивченість їх геномів та багатьох інших клітинних процесів. Тому на сьогодні не існує достатньо ефективних протоколів їх генетичної трансформації. У зв'язку з цим, активно розробляються більш досконалі технології, які б сприяли отриманню генотипів, що мають покращені агрономічні якості. Отримання власних біотехнологічних рослин на основі перспективних сортів вітчизняної селекції зі стійкістю до найбільш поширених гербіцидів є актуальним, оскільки зробить вирощування сільськогосподарських рослин, і злаків зокрема, рентабельнішим та екологічно чистим (Green, 2012; Vencill et al., 2012), а також незалежним від імпорту посівного матеріалу. Успішному технологічному вирішенню цих питань сприяє прогрес, досягнутий в останні десятиріччя в галузі фундаментальних досліджень структурно-функціональної геноміки, теоретичних і практичних аспектів генетичної трансформації ряду культурних рослин (Shrawat, Armstrong, 2018). Біотехнологічні підходи дозволяють передавати бажані гени з будь-якого організму і тим самим збільшувати доступний генофонд для їх поліпшення.

Створення високоврожайних пластичних сортів рослин, з комплексом цінних технологічних властивостей, значною мірою залежить від ефективності оцінки селекційного матеріалу. Найефективнішим методом оцінки є ДНК-технології на основі молекулярних маркерів (Xu et al., 2013; Yabe, Iwata, 2020; Моргун та ін., 2021). Методи молекулярної селекції, засновані на полімеразній ланцюговій реакції, вже сьогодні дозволяють підійти до аналізу генетичного поліморфізму на рівні нуклеотидних

послідовностей генів та розширити можливості створення сортів з певними технологічними ознаками. Інформація про алельний стан генів може бути отримана на ранніх етапах розвитку до цвітіння рослини, що дозволяє відбирати потрібні генотипи, не очікуючи на аналіз зерна, що значно прискорює селекційний процес. Зважаючи на це, пошук нових, більш ефективних і зручних ДНК-маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу, продовжує бути вкрай актуальним.

Економічна ефективність генетико-селекційної роботи виявляється не тільки у виведенні поліпшеного сорту, а й у термінах його створення й освоєння виробництвом. Застосування біотехнологічних підходів та ДНК-маркерів у 2–3 рази прискорює отримання нових сортів, сприяє зменшенню масштабів і скороченню термінів селекційних програм, що зумовлює доцільність їх використання у селекційному процесі.

Слід зазначити, що в Україні комплексні програми генетичного поліпшення рослин із застосуванням методів молекулярної селекції та біотехнологічних підходів тільки починають розроблятися. Відсутність сукупності оптимізованих методів, які надали б можливість контролювано добирати генотипи на різних етапах селекції, сповільнює процес створення вітчизняних конкурентоспроможних сортів. Розробка таких технологій сприяє проведенню цілеспрямованого добору вихідного матеріалу та розширює можливості щодо прискорення селекції сортів з певними технологічними ознаками, зокрема й з поліпшеною якістю зерна, стійких до екологічних стресових впливів. Це зумовлює актуальність, новизну та практичну значимість запропонованої теми досліджень.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії за темами НДР: «Моніторинг селекційних зразків кукурудзи на наявність спонтанно занесених трансгенних подій, які зареєстровані у Європейському союзі» (№ держреєстрації 0110U004025, 2010 р.); «Виявлення генетичних послідовностей, які детермінують якісні

характеристики зерна та стійкість до стресових факторів у кукурудзи» (№ держреєстрації 0112U002802, 2012 р.); «Вивчення молекулярно-генетичних основ та фізіологічних особливостей адаптації до абіотичних стресів на прикладі рослин Антарктики» (№ держреєстрації 0112U002937, 2012–2013 рр.); «Отримання та вивчення молекулярно-біологічних і генетичних особливостей стійких до гербіцидів сільськогосподарсько важливих культур» (№ держреєстрації 0110U006082, 2010–2014 рр.); «Впровадження молекулярних систем визначення генетичного й епігенетичного поліморфізму озимої пшениці для отримання високопродуктивних спеціалізованих сортів» (№ держреєстрації 0114U002736, 2014 р.); «Розробка систем молекулярних маркерів для відбору корисних ознак у зернових культур» (№ держреєстрації 0113U003101, 2013–2015 рр.); «Дослідження функціонування та адаптації рослин в умовах біотичних та абіотичних стресів за допомогою молекулярних маркерів» (№ держреєстрації 0112U001735, 2012–2016 рр.); «Вивчення молекулярно-генетичних особливостей генетично модифікованих культурних рослин та встановлення закономірностей функціонування трансгенів» (№ держреєстрації 0113U003100, 2013–2017 рр.); «Розробка систем генотипування та маркування цінних біологічних ознак сільськогосподарських культур» (№ держреєстрації 0116U000173, 2016–2018 рр.); «Використання молекулярних та клітинних технологій для отримання біотехнологічних рослин пшениці та кукурудзи, стійких до гербіциду гліфосату» (№ держреєстрації 0115U004187, 2015–2019 рр.); «Дослідження цінних генетичних детермінант і нових алельних ефектів генів для поліпшення хлібних злаків в умовах негативного впливу глобальних кліматичних змін» (№ держреєстрації 0117U000385, 2017–2021 рр.); «Дослідження молекулярно-біологічних і фенотипових проявів функціонування перенесених генів та особливостей їх успадкування у біотехнологічних рослин» (№ держреєстрації 0118U003663, 2018–2022 рр.); «Створення молекулярно-генетичної платформи для проведення маркер-

допоміжної селекції» (№ держреєстрації 0119U100597, 2019–2021 рр.); «Розробка біотехнологій рослин роду *Triticum* для підвищення їх врожайності» (№ держреєстрації 0120U103770, 2020–2024 рр.).

Мета та завдання досліджень. Мета роботи полягала у створенні методами генетичної інженерії рослин пшениці і кукурудзи, стійких до гербіцидів, а також розробці методичних та практичних засад використання молекулярно-генетичних маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

Для досягнення поставленої мети вирішували наступні задачі:

- розробити принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*;
- визначити оптимальні умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці в культурі *in vitro* та методом *in planta*, отримати генетично модифіковані рослини, стійкі до фосфінотрицину, та підтвердити інтеграцію перенесених генів;
- оптимізувати окремі параметри біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* кукурудзи, отримати та проаналізувати трансгенні рослини, стійкі до гліфосату та фосфінотрицину;
- провести моніторинг розповсюдження зареєстрованих трансформаційних подій кукурудзи на території України;
- розробити методичні основи та практичні засади використання ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки;
- проаналізувати сорти, лінії та селекційні зразки озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації та охарактеризувати їх цитологічні та господарські особливості;

- виявити генотипи озимої пшениці з алелями генів високої якості зерна та іншими цінними генами та дослідити їх на можливість використання як донорів господарсько-корисних ознак;
- обґрунтувати новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна;
- розробити теоретичні основи і практичні методи використання та контролю досліджених генів і генетичних систем у селекції пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак;
- на основі поєднання можливостей класичної і молекулярної генетики та комплексного використання нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій створити біотехнологію селекційного процесу;
- створити цінний вихідний селекційний матеріал та сорти пшениці м'якої озимої, придатні для використання в генетичних дослідженнях та аграрному виробництві.

Об'єкт дослідження: поліпшення злакових культур методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції.

Предмет дослідження: створення і аналіз трансгенних рослин пшениці та кукурудзи, стійких до гербіцидів, в умовах *in vitro* і методом *in planta*; застосування ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму та генотипування зернових культур за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

Методи дослідження. Біоінформатичні, біотехнологічні (методи культури тканин і органів рослин *in vitro*; біолістична та *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in vitro* та *in planta*); молекулярно-генетичні методи (клонування послідовностей ДНК; виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу; спектрофотометричне вимірювання загальної рослинної ДНК; полімеразна ланцюгова реакція; проведення електрофорезу ДНК в агарозному та поліакриламідному гелях; біохімічні (визначення вмісту білка); фізичні (інфрачервоної спектрометрії); методи статистичної

обробки експериментальних даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин. На основі біоінформатичного аналізу послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica* показана висока (понад 90 %) гомологія з мітохондріальними геномами представників родини Злакових (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii* та ін.). Сиквеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*.

Вперше вивчено вплив синтетичних регуляторів росту піклораму та дикамби на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta* та отримано рослини, стійкі до фосфінотрицину. Удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи в культурі *in vitro* методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та отримано трансгенні рослини, стійкі до гліфосату та фосфінотрицину.

Досліджено рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR-повторами різних ретротранспозонів, у трансгенних калюсних культур та рослин-регенерантів пшениці та виявлено їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. Одержані дані свідчать, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів.

Розроблено нову вдосконалену методику детекції трансформаційних подій на основі мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції, та проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин кукурудзи на території України, який засвідчив їх наявність з частотою від 4 до 10 %.

Створено 9 систем на основі IRAP та 5 систем на основі REMAP-маркерів, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між

ретротранспозонами різних видів злакових культур. Встановлено, що кожен з вивчених сортів злаків має свій певний спектр ампліфікованих IRAP та REMAP-продуктів, що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. На основі отриманих даних показано відмінності досліджених сортів за геномною варіабельністю та визначено рівень їх філогенетичного споріднення. Показано ефективність застосування IRAP-маркерів для підтвердження змін у геномі тритикале під дією мутагенів та для добору мутантних рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*.

На підставі застосування різних взаємодоповнюючих молекулярно-генетичних маркерних систем, їх адаптації для проведення мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій, обґрунтовано наукові основи молекулярної селекції пшениці на високі продуктивність та хлібопекарську якість. Розроблено і оптимізовано систему ДНК-маркерів для добору та генотипування сортів пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Проведено скринінг нових, елітних та стародавніх сортів м'якої та твердої пшениці на розповсюдження алельних варіантів господарсько-корисних генів та відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки.

Отримала подальший розвиток концепція про роль генів дикорослих співродичів у генетичному поліпшенні якості зерна культурної пшениці. Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm193*, *Xgwm219*, *Xgwm508*, *Xgwm626*. Виконані комплексні дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1* дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці з поліпшеною якістю зерна.

Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* пшениці методом ПЛР. Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за

підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення. На основі отриманих даних опрацьовано теоретичну концепцію використання та контролю досліджених генів і генетичних систем у селекції пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак.

Виявлено, що підібрані маркерні системи є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Встановлено, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації. На підставі цитогенетичного аналізу виявлено, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

Науково обґрунтовано новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна, що є основою для появи на продовольчому ринку нашої держави нових продуктів функціонального харчування.

Вперше в Україні розроблено біотехнологію селекційного процесу, яка базується на поєднанні можливостей класичної і молекулярної генетики, з активним використанням нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій. На основі найсучасніших досягнень інтрогресивної селекції, молекулярної генетики й біотехнології розроблено теоретичні основи і методи створення високопродуктивних сортів озимої пшениці, яким властиві висока якість зерна та стійкість до стресових чинників довкілля.

Практичне значення. Отримані трансгенні рослини м'якої пшениці та кукурудзи, стійкі до гербіцидів, придатні для використання в селекційних програмах з генетичного поліпшення даних культур. Розроблені способи

створення генетично модифікованих рослин можуть застосовуватися як елементи біотехнологічних, молекулярно-генетичних та селекційних програм, а також використовуватися для створення нових біотехнологічних рослин з іншими цільовими генами різного походження. Запропоновано до практичного використання способи детекції трансформаційних подій, які дозволяють прискорити процес їх аналізу.

Розроблені маркерні системи можуть бути застосовані для генотипування різних генотипів, сортів і популяцій злакових культур. Підібрані системи ДНК-маркерів придатні для дослідження генетичного різноманіття злаків у селекційних дослідженнях для їх генетичного поліпшення.

Серед проаналізованих генотипів пшениці виявлено потенційні донори цінних алелів, зокрема *Glu-B1a1*, який позитивно впливає на хлібопекарську якість борошна; *Gpc-B1*, що детермінує підвищення вмісту білка і мікроелементів; *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки; *Psy*, що відповідає за накопичення каротиноїдів у зерні; *Pro*, який контролює низьку активність поліфенолоксидазних ферментів зернівки; *Wx*, який зумовлює знижений вміст амілози в зерні. Результати вивчення міжсортного та внутрішньосортного поліморфізму за дослідженими цільовими генами, впроваджені у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, спрямовані на усунення гетерогенності та підвищення генетичної чистоти (гомогенності) сортів зернових злаків та їх поліпшення за головними технологічними характеристиками якості зерна.

У результаті багаторічних наукових досліджень створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації різного напрямку використання. До Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Російській Федерації та Республіці Молдова занесено 31 сорт пшениці м'якої озимої, в тому числі в Україні – 29 сортів ('Астарта',

‘Софія Київська’, ‘Донор Київський’ та інші), в Російській Федерації – сорт ‘Астарта’, в Республіці Молдова – сорт ‘Сотниця’. Дані сорти на державному рівні визнані селекційним досягненням, а їх новизна закріплена авторськими свідоцтвами України, Російської Федерації та Республіки Молдова. Нові сорти стійкі до несприятливих чинників довкілля, забезпечують отримання високих урожаїв зерна високої якості. Кваліфікаційну експертизу в Державному сортовивченні України, Республіці Казахстан та Республіці Туреччина проходять 13 сортів пшениці м’якої озимої в тому числі: в Україні – 9 сортів (‘Альта’, ‘Степова криниця’, ‘Нагорода’, ‘Довіра’, ‘Вежа Київська’, ‘Благовіщенська’, ‘Трояна’, ‘Благодатна’, ‘Синтетик 240’), в Республіці Казахстан – сорт ‘Снігурка’, в Республіці Туреччина – 3 сорти пшениці м’якої озимої (‘Бужанка’, ‘Новосмуглянка’, ‘Соломія’).

Нові сорти пшениці м’якої озимої, створені методом хромосомної інженерії (‘Смуглянка’, ‘Золотоколоса’, ‘Фаворитка’, ‘Астарта’ та інші), забезпечили отримання рекордних урожаїв зерна – 124–140 ц/га, успішно конкурують із зарубіжними аналогами і займають великі посівні площі. Вони мають комплексний імунітет до основних хвороб і придатні для вирощування в органічному землеробстві та на зрошенні. Сорти пшениці м’якої озимої (‘Здоба Київська’, ‘Софія Київська’, ‘Городниця’, ‘Аміна’, ‘Джамала’, ‘Донор Київський’ та інші), які відносяться до сильних пшениць, мають високу якість зерна. Серед них унікальний сорт ‘Донор Київський’, котрий за якістю відноситься до екстрасильних пшениць, має високий вміст білка (18–20 %) та його якість (показник сили борошна W 450–900 о.а.).

Наукові розробки дисертації використані здобувачем в лекційному курсі при навчанні аспірантів та студентів за дисципліною «Генетика рослин, біоінженерія» в Національному технічному університеті України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» та в Київському національному університеті імені Тараса Шевченка. Результати дисертаційних досліджень висвітлено в монографії «Ячмінь як продукт

функціонального харчування», яка відзначена премією Національної академії аграрних наук України «За видатні досягнення в аграрній науці».

Особистий внесок здобувача. Результати досліджень, що представлені у дисертації, одержано автором роботи у відділі молекулярної генетики Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням Моргуна Богдана Володимировича, у якій висвітлено власні результати досліджень автора. Безпосередньо автором розроблено концепцію і структуру роботи, здійснено інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації, лабораторні і польові дослідження, розробку ДНК-технологій, ідентифікацію алелів маркерних локусів, аналіз даних, формулювання узагальнень та висновків. Співавторами наукових праць є науковий консультант та науковці, спільно з якими проведено дослідження. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантові належить фактичний матеріал і основний творчий доробок. Усі наукові узагальнення, положення, результати та висновки, викладені у дисертації, сформульовано автором особисто.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації були представлені та доповідались на міжнародних конференціях «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Алушта, 20–24 вересня 2013 р.; Умань, 22–24 вересня 2014 р.; Чернівці, 14–19 вересня 2015 р.; Одеса, 12–16 вересня 2016 р.; Яремче, 17–21 вересня 2018 р., Київ, 15–20 вересня 2019 р.); XI, X з'їздах Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова (Алушта, 24–28 вересня 2012 р.; Умань, 16–20 вересня 2017 р.); «Plant-Based Vaccine and Antibody Conference», Verona, Italy, June 18, 2007; «Генетично модифіковані (біотехнологічні) рослини: перспективи використання та проблеми біобезпеки», Київ, 6–8 жовтня 2009 р.; «Modern biotechnology of agricultural plants and biosafety (plant genome VI)», Odesa, September 7–10, 2010); «Современные аспекты генетической инженерии растений» Київ, 30 травня – 1 червня, 2011 р.; «Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи», Київ, 2011 р.; «World

Congress on *In Vitro* Biology», Washington, USA, June 3–7, 2012; «Новітні досягнення біотехнології», Київ, 24–25 жовтня 2013 р.; «Plant Genomics and Biotechnology», Київ, 23 грудня 2013 р.; «Регуляція росту і розвитку рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти», Харків, 11–13 листопада 2014 р.; «Plant Physiology and Genetics – Achievements and Challenges» Sofia, Bulgaria, September 24–26, 2014; «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», Мінськ, 13–16 жовтня 2015 р.; «57th Annual Maize Genetics Conference», Charles, Illinois, USA, March 12–15, 2015; «Advances in Cell Biology and Biotechnology», Львів, 11–13 жовтня 2015 р.; «Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці», Одеса, 1–3 червня 2016 р.), «Геноміка та біохімія сільськогосподарських рослин», Одеса, 12 вересня 2017 р.; «Біотехнологія – інноваційний шлях розвитку селекції рослин», Одеса, 8–10 жовтня 2018 р.; 3rd IPFS International Symposium, Fuzhou, China, December 15–18, 2018; «SmartBio», Kaunas, Lithuania, May 2–4, 2019; «Agrobiodiversity for improve the Nutrition, Health and Quality of Human and Bees Life», Nitra, Slovakia, September 11–13, 2019; «Plant and Animal Genome Conference», USA, January 2019; 5th International ICDRA conference on Duckweed Research and Applications, Rehovot, Israel, September 9–12, 2019; «Plant genome stability and change», Leiden, Netherlands, June 7–10, 2020; «The 45th FEBS Congress», Liubliana, Slovenia, July 3–8, 2021. Основні результати наукових досліджень також висвітлювалися на щорічних заходах Міжнародної науково-практичної конференції «День Поля», яка проводилася в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (2007–2020 рр.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 3 монографії у співавторстві, 55 статей у провідних фахових виданнях України і зарубіжних виданнях, 25 тез у матеріалах всеукраїнських та міжнародних конференцій і з'їздів, 7 патентів (1 – на винахід, 6 – на корисну модель), 29 авторських свідоцтв України, 1 авторське свідоцтво Російської Федерації, 1 авторське свідоцтво Республіки Молдова.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, 8 розділів (огляд літератури; матеріали і методи досліджень; 6 експериментальних розділів), висновків, узагальнення та списку посилань. Дисертаційна робота викладена на 508 сторінках машинописного тексту, містить 172 рисунки, 58 таблиць. Список посилань налічує 422 джерела.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасний стан та основні напрями генетичного поліпшення рослин

Генетичне поліпшення рослин і створення сортів нового покоління – один із головних засобів прогресу в сучасному рослинництві. Його головним завданням на даний час є створення сортів з високим генетично детермінованим потенціалом продуктивності та якості, стабільною стійкістю до хвороб, шкідників, дії несприятливих чинників навколишнього середовища. Успішне вирішення цього завдання пов'язане з постійним удосконаленням селекційного процесу, його інтенсифікацією через розширення генетичного різноманіття і впровадження в селекційний процес новітніх досягнень генетики, біотехнології, геноміки, молекулярної біології та інших суміжних наук. Провідні науковці світу вважають, що саме генетичне поліпшення рослин невдовзі спричинить нову «зелену революцію», яка дасть змогу істотно збільшити обсяги виробництва продовольства на нашій планеті (Моргун, Рибалка, 2017).

Очікується, що у найближчі роки прискорення розвитку агровиробництва буде пов'язане з генетичними дослідженнями, що дозволить впродовж 20–25 років подвоїти врожаї. Тому до проблеми створення принципово нового покоління рослин прикута особлива увага в усьому світі, і задля її вирішення виділяються значні фінансові ресурси. Так, CIMMYT оголосив про початок роботи над Глобальною програмою пшениці (Global Wheat Program), спрямованої на забезпечення фермерів високоврожайними сортами пшениці, стійкими до посухи, шкідників, хвороб і пристосованими до малородючих ґрунтів. Великі транснаціональні компанії та міжнародні проекти також мають на меті в найближчі 20 років збільшити генетичний потенціал урожайності сільськогосподарських культур на 50 і навіть на 100 % (Моргун, 2017).

Практика свідчить, що на основі широкого використання нових сортів і гібридів сільськогосподарських рослин, застосування добрив, пестицидів, зрошення, засобів механізації, починаючи з 50-х років XX ст., вдалося вдвічі-втричі й більше підвищити врожайність кукурудзи, пшениці, рису, овочевих, плодових, технічних та інших культур. Крім підвищення врожайності сільськогосподарських культур реалізація деяких селекційно-генетичних програм дала змогу створити сорти і гібриди рослин з вищим вмістом білка (у тому числі незамінних амінокислот), цукрів, вітамінів та інших біологічно цінних речовин, що сприяло не тільки збільшенню виробництва продуктів харчування, а й поліпшенню їхньої якості.

Спеціальними дослідженнями, які проведено в країнах Західної Європи, доведено, що внесок наукової селекції в досягнутий за останні 25 років приріст урожайності становить (%): 59 – по озимій і 20 – по ярій пшениці, 58 – по ярому і 32 – по озимому ячменю, 80 – по кукурудзі на зерно. Наприклад, за останні роки у Великій Британії створено сорти пшениці з потенціалом урожайності 100–140 ц/га. Ці сорти стійкі до підвищеного рівня азотного живлення, високої щільності стеблостою і практично не потребують використання ретардантів. Внесок селекції в цей приріст – 63 %.

Слід зазначити, що і українські селекціонери мають дуже вагомий досягнення в галузі генетичного поліпшення рослин (Кунах, 2018). Наприклад, завдяки цілеспрямованій роботі вперше за всю історію України сорти пшениці селекції Інституту фізіології рослин і генетики НАН України ‘Смуглянка’, ‘Золотоколоса’ і ‘Фаворитка’ сформували рекордний врожай 124 – 131,8 ц/га. Усього в Інституті створено понад 170 сортів культурних рослин, які впродовж понад 40 років висіваються у виробництві на площі від 1,0 до 5,5 млн га, чим роблять вагомий внесок у забезпечення продовольчої безпеки нашої країни (Моргун, 2019, 2020).

Інтенсифікація селекційної роботи останніми роками дала можливість значно підвищити продуктивність праці селекціонера, скоротити терміни виведення нових сортів. На створення нових сортів потрібна величезна

кількість інтелектуальної праці та матеріальних витрат. За даними компанії Asgrow Seed (США), на виведення нового сорту в середньому витрачається 11,1 року без обліку часу на оцінювання, сортовипробування, маркетинг тощо. Витрати на створення нового сорту пшениці становлять як мінімум 1,5 млн євро і можуть бути у 5–10 разів більшими. Величезні обсяги фінансування досліджень з генетичного поліпшення рослин красномовно свідчать про усвідомлення людством глобальності і значущості проблеми продовольчої безпеки. Саме тому селекція рослин на сьогодні стала найбільш інноваційною галуззю у світі, в якій 12–15 % обороту коштів спрямовується на розвиток, що можна порівняти хіба що з інформаційними технологіями (Моргун, 2015).

Генетичне поліпшення рослин ґрунтується на концепціях генетики, фізіології, біохімії рослин та інших суміжних наук. Дедалі більшого значення набуває впровадження досягнень біотехнології в генетико-селекційний процес. В останні роки біотехнологія стає одним з новітніх інструментів сільськогосподарських досліджень (Kosakivska et al., 2019). У поєднанні з традиційною практикою селекції, вона робить внесок у розвиток нових методів генетичних змін розвитку рослин та їх продуктивності. Це насамперед розроблення нових технологій селекційного процесу на основі вдалого поєднання традиційних методів селекції і досягнень клітинної та генної інженерії. Нині розроблені і впроваджуються у практику селекційної роботи такі основні клітинні технології: клональне мікророзмноження і одержання безвірусного матеріалу, одержання соматоклональних варіантів, генна інженерія, клітинна біологія, біометоди і біопрепарати для захисту від шкідників, хвороб, бур'янів, застосування регуляторів росту тощо (Дубровна та ін., 2012; Кунах та ін., 2016; Bublyk et al., 2020; Косаківська та ін., 2021).

Останніми десятиріччями набули значного поширення біотехнологічні дослідження, під час яких використовують методи генетичної інженерії для створення модифікованих сортів, стійких до гербіцидів, комах, вірусів, грибних та бактеріальних хвороб. Крім того, ці методи застосовують також

для підвищення стійкості рослин до абіотичних чинників та регуляції строків їх дозрівання. Біотехнологічні підходи дозволяють передавати бажані гени з будь-якого організму, тим самим збільшувати доступний генофонд для поліпшення (Дубровна та іш., 2014; Kuchuk, 2017; Symonenko et al., 2021).

У доступній для огляду історії науки генетично модифіковані організми – третій ступінь істотного генетичного поліпшення рослин. Першим було відкриття і використання генетично регульованого гетерозису, яке дало збільшення продуктивності перехреснозапильних культур на 20–25 %. Другий – використання спонтанного та індукованого мутагенезу, що породило «зелену революцію». І ось сьогодні настала ера трансгенних рослин. Це дасть можливість створити ультратранні сорти, стійкі до холоду і посухи, принципово змінити технологію й ареал вирощування багатьох культур, збирати два врожаї на рік, скоротити посівні площі, матеріальні витрати і собівартість продукції. У зв'язку з цим, основні дослідження біотехнологів спрямовані на створення поліпшених і принципово нових генотипів, що мають одиничну, групову або комплексну стійкість до біотичних або абіотичних стресових чинників довкілля за збереження і підвищення їх продуктивності та якості (Vain, 2007; Kuchuk, 2017).

Генетично модифіковані сільськогосподарські культури поступово завойовують світ. Річний оборот світової біоіндустрії становить на даний час більше 200 млрд дол. США. За інформацією International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA) з 1996 і до кінця 2019 року загальна площа посівів ГМО-культур збільшилася у 29 країнах у 90 разів і становить 190,4 млн га – близько 12 % всіх посівних площ світу. В цілому, біотехнологічні культури дозволені для виробничого використання в 72 країнах (включаючи ЄС), де проживає 75 % населення Землі. Показано, що застосування ГМ-технологій дозволило знизити використання гербіцидів на 8,8 %, що запобігло внесенню 393 млн тонн пестицидів, а негативний вплив на навколишнє середовище зменшено на 20 % порівняно з тим, який, ймовірно, був би досягнутий в разі засівання всіх площ тільки традиційними

сортами рослин. Стійкі до гербіцидів культури дозволяють використовувати мінімальну і нульову обробку ґрунту, що знижує його ерозію. Щорічно вводяться у виробництво нові ГМ-рослини. Наприклад, з 2010 р. у США і Канаді вирощується кукурудза «Smart Stax» з 8 впровадженими генами, що визначають 3 нових корисних ознаки, в ЄС – картопля «Амфлора» зі збільшеним вмістом крохмалю. У 2012 р. на Філіппінах, в Індії, Індонезії, Малайзії та В'єтнамі впроваджений стійкий до пірікуляріозу «золотий рис»; в 2012–2013 рр. у Китаї впроваджений ГМ-рис і збагачена ферментом фітазою кукурудза. З 2012 року у США вперше культивується трансгенна кукурудза, стійка до посухи, а з 2016 року посухостійка кукурудза вирощується в субпустелях Африки (Моргун та ін., 2016).

Створення високоврожайних пластичних сортів сільськогосподарських культур, з комплексом цінних технологічних властивостей, значною мірою залежить від ефективності оцінки селекційного матеріалу. Найефективнішим методом оцінки є розробка ДНК-технологій на основі молекулярних маркерів (Смарагдов, 2009; Ivanovych, Volkov, 2018). Сьогодні у світі селекційні дослідження повністю перейшли на новий молекулярний рівень, що у 2–3 рази прискорює селекційний процес. Застосування молекулярно-генетичних маркерів сприяє зменшенню масштабів і скороченню термінів селекційних програм, а також формуванню сучасного уявлення про особливості організації та еволюції організмів. Наразі ДНК-технології широко застосовують для розробки способів управління потоком генетичної інформації (селекція за допомогою молекулярно-генетичних маркерів – MAS). З цією метою здійснюється картування, маркування основних генів кількісних ознак – QTL; збереження біорізноманіття на основі використання молекулярно-генетичних маркерів; розробка генетично обґрунтованих програм збереження, розмноження і підбору батьківських форм рослин з урахуванням даних екологічної генетики.

Методи молекулярної селекції, засновані на полімеразній ланцюговій реакції, вже сьогодні дозволяють підійти до аналізу генетичного

поліморфізму на рівні нуклеотидних послідовностей генів, та в найближчому майбутньому розширять можливості щодо прискорення селекції сортів з певними технологічними ознаками. Інформація про алельний стан генів може бути отримана на ранніх етапах розвитку до цвітіння рослини, що дозволить відібрати потрібні генотипи, не очікуючи на аналіз зерна, що значно прискорить селекційний процес. Такі алелі, як наприклад відомий *Glu-B1a1* з екстрасильним позитивним впливом на якість борошна пшениці, можуть бути надійно ідентифіковані виключно шляхом ПЛР-аналізу (Рибалка та ін., 2012).

Значення віддаленої гібридизації в створенні нового вихідного матеріалу особливо велике на сучасному етапі селекційної роботи, коли дуже часто виникає гостра необхідність вийти за межі виду для запозичення необхідних властивостей від інших видів. Потенційні можливості віддаленої гібридизації далеко ще не вичерпані, належить розкрити багато невідомих механізмів взаємодії цитоплазми і ядра різних видів при їх об'єднанні в одну зародкову клітину.

Генетичне поліпшення рослин зумовлюється зростаючими вимогами сільськогосподарського виробництва до сортів. Безсумнівно, для подальшого прогресу у створенні сортів нового покоління необхідно розвивати нові методи біотехнології, генетичної інженерії, молекулярної селекції, поглиблювати фундаментальні дослідження в області біології рослин. За наявності докладної інформації про місцезнаходження і функцію гена(ів) корисних ознак, вчені в майбутньому будуть добре оснащені для ефективного створення сортів з точними комбінаціями бажаних ознак.

1.2. Біотехнологічні методи створення нового покоління сортів злакових культур

Для генетичного поліпшення рослин, в основному, використовують такі біотехнологічні методи, як клітинна селекція та генетична інженерія.

Клітинна селекція. На даний час одним із перспективних напрямів, які дають можливість підвищити ефективність створення нових форм рослин, є використання клітинної селекції. При цьому селекція *in vitro* проводиться на ознаки, які можуть проявлятися на клітинному рівні, зокрема збільшену експресію певних генів, що є головними перемикачами метаболічних шляхів, які забезпечують толерантність до стресових чинників. Виходячи з визначення адаптаційних властивостей рослин, як генетично детермінованого процесу формування систем стійкості організму, що проявляється на різних структурних рівнях, його вдосконалення можливе в умовах *in vitro* (Кунах, 2005; Дубровна, 2017).

Клітинна селекція є методом створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і соматоклональних варіантів у селективних умовах. Селекція *in vitro* є як би розвитком мутаційної селекції, проте реалізується на рівні одиничних клітин із застосуванням техніки *in vitro*, що надає їй більш широкі можливості. Технології клітинної селекції, що розробляються для основних сільськогосподарських культур, ґрунтуються на наявних загальних механізмах стійкості для ізольованих клітин і цілих рослин (Моргун та ін., 2016).

Переваги клітинної селекції над традиційними методами полягають перш за все в економії місця та можливості працювати з великими вибірками генотипів; більшій швидкості скринінгу селекційного матеріалу; менших об'ємах матеріальних витрат; можливості контролювати умови зовнішнього середовища. Крім того, генетичні зміни можна посилити шляхом створення нових генетичних комбінацій, їх добору та передачі регенерантам; існує можливість отримання стійкості до кількох стресових чинників. У більшості випадків селекцію *in vitro* застосовують для отримання форм рослин, стійких до біотичних (патогени, токсини або їх аналоги) та абіотичних (екстремальні температури, водний дефіцит, засолення, токсичні метали, солі важких металів, гербіциди, ультрафіолетове опромінення) стресів (Дубровна та ін., 2014).

Слід зазначити, що для селекційного процесу технології клітинної селекції мають великі перспективи. Завдяки даним біотехнологіям отримано численні генетично марковані клітинні лінії та рослини, які широко використовуються в якості вихідного матеріалу для різних прикладних досліджень. Методи клітинної селекції поступово удосконалюються, і спектр різних мутантів, отриманих *in vitro*, з кожним роком розширюється. Незважаючи на певні труднощі, на сьогоднішній день у багатьох провідних країнах світу клітинна селекція є важливим компонентом селекційної роботи та доповнює класичні методи добору.

1.2.1. Генетична трансформація злаків

Генетична інженерія рослин – це технологія створення генетично модифікованих форм шляхом перенесення функціонально активних генетичних структур (рекомбінантних ДНК), сконструйованих *in vitro*, в ДНК організму, що модифікується. При цьому рекомбінантні ДНК стають складовою частиною генетичного апарату реципієнтного організму і надають йому нові унікальні генетичні, біохімічні, а потім і фізіологічні властивості. Генетична модифікація рослин може здійснюватись за допомогою спеціальних векторів або шляхом прямого перенесення генів.

У провідних біотехнологічних центрах світу широко проводяться роботи зі створення нових форм сільськогосподарських рослин методами генетичної інженерії, оскільки розробки методів культури тканин у поєднанні з генетичною трансформацією відкривають значно ширшу область для генетичного поліпшення рослин. Останніми десятиріччями значно поширені біотехнологічні дослідження для створення модифікованих сортів, стійких до гербіцидів, комах, вірусів, грибних та бактеріальних хвороб (Gelvin, 2003; Abid et al., 2014; Hiei et al., 2014). Крім того, ці методи застосовують також для підвищення стійкості рослин до абіотичних чинників та регуляції строків їх дозрівання. Біотехнологічні підходи дозволяють

передавати бажані гени з будь-якого організму, тим самим збільшувати доступний генофонд для поліпшення.

Перша генерація трансгенних культур була створена для підвищення їх стійкості до вірусних інфекцій, гербіцидів і комах (Vain, 2007). Друга генерація трансгенних культур сформувалася до 2005 р. і продовжує активно розвиватися. При її створенні враховувалися такі вимоги: 1) стійкість до абіотичних стресорів – посухи, засолення, забруднення ґрунту важкими металами, низьких і високих температур; 2) стійкість до бактеріальних і грибних хвороб; 3) стійкість до гербіцидів; 4) поліпшення смакових і ароматичних властивостей продуктів харчування; 5) підвищення поживної цінності продуктів (білки, жири, вітаміни, мінерали); 6) можливість тривалого зберігання фруктів і овочів; 7) усунення алергенів; 8) використання трансгенних рослин для біофармацевтики – виробництва вакцин, терапевтичних білків людини, фармацевтичних препаратів; 9) можливість застосування модифікованих культур для фітореMediaції (Naqvi et al., 2010).

До 2025 р. заплановано створити третю генерацію сільськогосподарських трансгенних рослин, краще адаптованих до стресових впливів, які мають поліпшені поживні і біофармацевтичні властивості. При створенні третьої генерації трансгенних рослин вирішуються такі завдання: 1) сиквенування геномів рослин і виявлення функцій окремих генів та розробка на цій основі молекулярної селекції; 2) можливість зміни архітекtonіки рослин; 3) управління часом цвітіння; 4) контроль якості та кількості насіння; 5) підвищення ефективності фотосинтезу; 6) поліпшення асиміляції поживних речовин з ґрунту; 7) управління гетерозисом і апоптозом (Лобов и др., 2010).

На сьогоднішній день біотехнологічне поліпшення рослин у більшості випадків обмежується введенням окремих нових генів у геноми цільових видів. Однак багато агрономічних ознак може залежати від складної взаємодії між кількома генами, і для біотехнологічного поліпшення

конкретного виду може знадобитися доставка і експресія цілого генного комплексу. Крім того, генетична модифікація комерційно важливих видів рослин також потребує розробки нових інструментів для видалення і заміни існуючих трансгенів в клітинах рослин. У біотехнології рослин розглядаються дві основні проблеми – це розвиток тієї чи іншої технології для об'єднання кількох трансгенних ознак в одній рослині шляхом вбудовування ряду генів у той же самий хромосомний локус одним масивом і послідовні маніпуляції з цим масивом для редагування геному (Taverniers et al., 2008; Weinthal et al., 2010). У Мічиганському університеті США розроблена касетна система векторів, яка одночасно несла до дев'яти генів. Проведена успішна трансформація протопластів арабідопсису і показана стабільна трансформація всіх введених трансгенів (Chen et al., 2010). У геному рису шляхом доставки на двох незалежних молекулах Т-ДНК було одночасно вбудовано вісім різних генів (Peremarti et al., 2010).

Отримання трансгенних рослин – складний процес, що включає оптимізацію способів генетичної трансформації, відбір трансгенних варіантів із бажаними ознаками, отримання та аналіз їх насіннєвого покоління. Для генетичного поліпшення культурних рослин молекулярними біотехнологіями використовуються різні способи переносу рекомбінантних молекул ДНК в клітини та їх інтеграції в ядерний геном. Тривалий час найбільш розповсюдженим був метод інтеграції трансгенів шляхом мікробомбардування (Frame et al., 2002), завдяки якому були отримані перші біотехнологічні рослини кукурудзи. Біолістичний спосіб трансформації має такі недоліки як низька ефективність, нестабільність, мала ємність введеної конструкції і висока вартість.

Особливий інтерес мають методи генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, яка підходить для інфікування клітин більшості дводольних рослин, тоді як багато видів однодольних важко піддаються *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації. Основною проблемою є те, що кокультивування рослинних тканин з *Agrobacterium spp.*

часто призводить до загибелі клітин (Hansen, 2000). Тим не менш, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація однодольних видів рослин стала нещодавно важливим проривом у генетичній інженерії (Lupotto et al., 2004). Порівняно з біолістичним методом *Agrobacterium*-опосередкована трансформація має ряд переваг, а саме: можливість інтеграції одиничних копій Т-ДНК у транскрипційно-активні області ядерного геному, що забезпечує вищий рівень і стабільнішу експресію трансгенів, збільшує частоту коекспресії – здатність до інтродукції рекомбінантних молекул ДНК з генами, які кодують декілька ознак, й зменшує кількість трансгенних перебудов порівняно з біолістичним методом; має нижчу собівартість робіт.

На сьогодні *Agrobacterium*-опосередкована трансформація – один із головних способів, який широко використовується для отримання комерційних біотехнологічних рослин та вирішення фундаментальних питань біології, в тому числі пов'язаних із їх адаптацією до осмотичних стресів (Дубровна, Моргун, 2018). Слід зазначити, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація – перспективна для генетичного поліпшення культурних рослин система методів, за допомогою якої на даний час отримано ряд комерційних біотехнологічних продуктів. Однак, незважаючи на значні успіхи генетичної інженерії для багатьох сільськогосподарських рослин, в тому числі й злаків, *Agrobacterium*-опосередкована трансформація залишається не простим завданням.

Крім того, для отримання трансгенних рослин можливе використання методів, які передбачають застосування поліетиленгліколю (Maas, Werr, 1989), електропорації незрілих зародків (Xiaoyi et al., 1996), мікроспор (Fennel, Hauptmann, 1992), соматичних тканин (D'Halluin et al., 1992), протопластів, ізольованих від культури клітинної суспензії (Lyznik et al., 1992), або сумісно ці методи.

Багато факторів, що впливають на частоту *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації однодольних, були досліджені та висвітлені. До них відносяться: генотип, тип експланта, агробактеріальний штам,

векторна конструкція. Крім того, важливе значення мають умови інокуляції, кокультивування та селекції. Що стосується селективних маркерів, то для відбору трансформантів мають значення промотори їх генів. Ось чому зусилля дослідників спрямовані на розробку способів, які б сприяли підвищенню частоти переносу Т-ДНК у клітини та інтеграції рекомбінантних молекул у геном злаків. Звичайним чинником, який підвищує частоту трансформації злаків, є ацетосирінгон – індуктор, що може активувати двокомпонентну регуляторну VirA-VirG-систему (Gelvin, 2003), однак при цьому не завжди досягається позитивний ефект. Часто дослідники використовують антиоксиданти, які здатні збільшувати ефективність переносу Т-ДНК, зменшуючи гіперчутливу відповідь клітин до патогена, бактерицидну та осмотичну обробку, вичленення експлантів до або після агробактеріальної інфекції. Значний інтерес становить також тіосульфат натрію (Olhoft et al., 2001). Ідентифікація компонентів, що беруть участь у механізмах інтродукції Т-ДНК, також розширює можливості надійної трансформації генотипів. Так зокрема, додавання одного з рослинних генів, що бере участь у інтеграції Т-ДНК – гістону H2A, який кодується геном *rat5* арабідопсису, підвищує частоту трансформації кукурудзи за рахунок його надекспресії.

Оскільки трансформація за допомогою рекомбінантних штамів *Agrobacterium tumefaciens* може бути обмежена специфічністю хазяїна та спроможністю агробактерії досягати рослинних клітин, здатних до пагоноутворення, запропонована технологія SAAT (Sonication-Assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation), яка включає короточасну обробку рослинних тканин ультразвуком у присутності агробактерій (Trick, Finan, 1997). Позитивний ефект цього методу пов'язаний із формуванням значної кількості мікропоранень, що репаруються, на поверхні рослинних тканин. Це збільшує колонізацію агробактеріями та компетентність клітин до інфекції. На відміну від інших методів, SAAT дозволяє агробактерії проникнути через декілька шарів клітин, зокрема, до меристематичних тканин.

Agrobacterium tumefaciens – грамнегативна ґрунтова бактерія, здатна переносити Т-ДНК Ті-плазмід у клітини рослин. На цій властивості базується розробка молекулярних біотехнологій, основна перевага яких полягає в інтродукції одиничних копій рекомбінантних молекул ДНК у транскрипційно-активні області геному рослин, що підвищує ймовірність стабільної експресії трансгенів в кількох поколіннях (Тищенко, Моргун, 2004). Разом з тим, залишаються відкритими питання, пов'язані з генотип-незалежною трансформацією культурних рослин, а також фізіолого-біохімічними змінами, що відбуваються у відповідь на агробактеріальну інфекцію і на інтродукцію генів інтересу, які мають відношення до метаболізму.

Що стосується *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, поряд із незрілими зародками увага дослідників зконцентрована на використанні експлантів, клітини яких компетентні до агробактеріальної інфекції. У зв'язку з цим особливий інтерес мають клітини апікальної меристеми, з L2 шару яких здатні розвиватися генеративні структури, що формують гамети (Franz, Schel, 1992). Використовуючи апікальну меристему розміром 3–4 мм, отримано трансформовані рослини-регенеранти ряду гібридів кукурудзи, реалізація морфогенетичного потенціалу яких здійснювалась шляхом або соматичного ембріогенезу, або прямого органогенезу залежно від складу живильних середовищ та умов культивування (Sairam et al., 2003). Позитивні результати були отримані також при трансформації калюсу, індукованого від сегментів поздовжньо розщепленої області пагонів 7–10 денних проростків, які містили нодульну зону (Sidorov et al., 2006). Також були запропоновані методи ефективної індукції компетентного до агробактеріальної інфекції калюсу з листків кукурудзи, який формувався у темряві, з подальшим утворенням морфогенного калюсу на світлі і регенерацією з останнього стабільно трансформованих рослин (Abadi, 2007).

Більшість дослідників використовують середовища або на основі середовища Мурасіґе і Скуґа (Murashige, Skoog, 1962), або на основі N6-

середовища (Duncan, Widholm, 1988). Описані варіювання цієї процедури включають додавання, виключення або зміни концентрацій хімічних компонентів у середовищі і кожне варіювання вивчене специфічно для окремого генотипу. Додавання або видалення L-проліну із середовища показало, що це має позитивний ефект на культуру і отримання рослин (Duncan, Widholm, 1988). Зниження і підвищення концентрацій цукрів у регенераційному середовищі чинить різні ефекти на регенерацію. Додавання AgNO_3 до живильного середовища підвищує регенерацію пагонів (Duncan, Widholm, 1988). Заміна іонів двовалентного заліза на трьохвалентне у регенераційному середовищі сприяла не лише підвищенню частоти регенерації, а й генотип-незалежній індукції пагоноутворення з сегментів етіюльованих проростків на модифікованому N6-середовищі.

Найбільш важливий компонент у протоколах регенерації пагонів – це тип і концентрація регулятора росту. Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) або синтетичний ауксин 2,4-D додаються до регенераційного середовища окремо в концентраціях від 0,1 до 1 мг/л, і в комбінації з абсцизовою кислотою, цитокініни або цитокініни з гібереловою кислотою мають різні ефекти на рослинну регенерацію. Гіберелову кислоту (GA_3) додають до регенераційного середовища у концентраціях від 1 до 2 мг/л, окремо або у комбінації з цитокінінами. Середовища для регенерації найбільш часто містять цитокініни такі як кінетин у концентрації від 0,1 до 10 мг/л (Lu et al., 1983), зеатин, 6-бензиламінопурин (6-(γ,γ -диметилаллілоаміно)пурин або 10 % кокосового молока, що містить похідні зеатину. Ці протоколи показали, що вплив цитокінінів на регенерацію рослин кукурудзи варіює від відсутності ефекту до стимуляції пагоноутворення.

Таким чином, реалізація морфогенетичного потенціалу злаків за генетичної трансформації може досягатися через органогенез та соматичний ембріогенез. Звичайними проблемами, асоційованими з регенерацією з незрілих зародків та суцвіть, з меристематичних тканин, сегментів пагонів, калюсу, суспензійної ембріогенної культури є обмеження, пов'язані з

генотипною специфічністю, низькою частотою індукції калюсу й регенерації рослин, труднощами у збереженні тотипотентності протягом тривалого часу культивування, із соматоклональною мінливістю, формуванням химер. Для певних генотипів запропоновано протоколи регенерації, ефективні для генетичної трансформації, однак для більшості сільськогосподарсько важливих рослин вони є незадовільними, що потребує пошуку хімічних і фізичних чинників, які позитивно б впливали на тотипотентність трансформованих клітин.

1.2.1.1. Генетична трансформація кукурудзи

Для кукурудзи (*Zea mays* L.) запропоновано ряд способів генетичного удосконалення цієї культури сучасними біотехнологіями (Sidorov et al., 2006). Однак частота її трансформації, як і інших злакових рослин, залежить від ряду факторів, в тому числі агробактеріального штаму, векторної конструкції, експланта, умов інокуляції й кокультивування, та для багатьох генотипів є недостатньо високою. Ось чому розробка способів, які б сприяли підвищенню ефективності переносу Т-ДНК у клітини та інтродукції рекомбінантних молекул у геном кукурудзи є першочерговою задачею.

Як експланти у кукурудзи використовують калюси з незрілих зародків (Ishida et al., 2007; Frame et al., 2011). Так, трансформація на стійкість рослин кукурудзи до абіотичних стресів проведена з використанням калюсу, отриманого з незрілих зародків інбредних ліній, за допомогою біолістичного методу генетичною конструкцією PCA-35S-DREB, що несе транскрипційний фактор *DREB1A* арабідопсису під контролем промотора CaMV35S і селективний ген *bar*. Для оптимізації параметрів генної пушки були використані відстані в 6 і 9 см. Результати показали, що постріл на відстані 9 см, за попередньої обробки, дозволяє поліпшити транзйентну експресію гена в експланті. ПЛР-аналіз підтвердив наявність *DREB1A* і *bar* генів в одному з 11 трансформантів (Razi, Rahnama, 2012). За допомогою

біолістичної трансформації були отримані лінії кукурудзи з декількома агрономічно важливо генами, які надали стійкість до різних шкідників, гербіцидів суцільної дії і хвороб (Chien et al., 2008).

Для кукурудзи запропоновано розробки (Sairam et al., 2003; Shou et al., 2004), які з успіхом застосовуються за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Було проведено скринінг на сприйнятливості до трансформації клітин апікальної меристеми пагона і калюсів, отриманих з незрілих зародків. *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію проводили з використанням штамів LBA4404, що несуть вектори pBI121 і pCB001, з генами неоміцинофосфотрансферази (*nptII*) і β -глюкуронідази (*uidA*) під контролем промотора нопалінсинтази (*nos*) і 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти. Для активації *Agrobacterium tumefaciens* протягом 1 год перед трансформацією в суспензію вводили ацетосирінгон (3,5-dimethoxy-4-hydroxyacetophenone) в концентрації 200 мкМ. Кращим виявилось використання в якості експлантів калюсів з незрілих зародків, що мали високий рівень сприйнятливості клітин до трансформації (Myeong et al., 2014).

Розроблено спосіб *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, який полягає в тривалому культивуванні калюсів з незрілих зародків на агробактеріальному газоні (Danilova et al., 2009). Для трансформації використовували штам LBA4404 з плазмідною рB1121, що містить гени *nptII* і *uidA*, під контролем промотора 35S вірусу мозаїки цвітної капусти. При цьому прояв некрозу в тканинах і загибель клітин були відсутні. Показано успадкування введених генів. Автори сподіваються, що розроблений метод буде універсальним для широкого кола генотипів кукурудзи.

Гени, які застосовуються для генетичної трансформації кукурудзи. Посуха, холод, засолення і патогени, як правило, порушують фізіологічні процеси в рослинах і призводять до накопичення токсичних речовин, що викликають загибель рослин (Yong et al., 2015). Стійкість за певною ознакою контролюється різними генами. Більш того, вона досягається біохімічними

механізмами, наприклад синтезом антиоксидантів, транскрипційних факторів, що регулюють експресію генів, і визначається багатьма генами, які доповнюють один одного для досягнення ефективного захисту (Carena, 2005). У той же час за останні десятиліття молекулярна біологія і генетика досягли великих успіхів у галузі розшифровки геномів рослин, що дозволило визначити гени, що відповідають за ті чи інші цінні ознаки сільськогосподарських культур. Таким чином, з'явилася можливість штучно створювати генетичні конструкції, розмножувати їх і впроваджувати в рослини, застосовуючи різні векторні системи. Надалі такі генно-модифіковані рослини використовують для створення сортів з підвищеною врожайністю і якістю.

Найбільш поширеним абіотичним стресором є посуха, яка обмежує ріст рослин і продуктивність у всьому світі, з руйнівними економічними і соціологічними наслідками. Тому стало актуальним отримання посухостійких рослин і вирощування генетично модифікованої кукурудзи (Muhammad et al., 2015). Був ідентифікований і клонований ген анексина 1 з *Arabidopsis thaliana*, який позитивно впливає на механізм стресостійкості рослин під час посухи (Dorota et al., 2009). Ген *Annexinp35* був виділений з ДНК рослин (Kranz, Lorz, 1994), клонований у вектор pCAMBIA1300 і трансформований в рослини кукурудзи.

В ході численних досліджень виявлено, що гліцинбетаїн грає велику роль в механізмі захисту рослин за різних стресових умов. За допомогою генної інженерії були отримані посухостійкі рослини кукурудзи, здатні синтезувати гліцинбетаїн за допомогою ведення двох трансгенів – саркозинметилтрансферази (ApGSMT2) (Shih et al., 2009) і гена диметилгліцинметилтрансферази (ApDMT2) (Robert, 2013), отриманих з бактерії *Aphanothese halophytica*. Саузерн-блот і ПЛР-аналіз показали, що обидва гени були інтегровані в геном кукурудзи і мали підвищений рівень експресії в умовах посухи, що сприяло накопиченню гліцинбетаїна в листках трансгенних рослин кукурудзи. Також виявлено підвищене накопичення

цукрів, амінокислот, високий вміст хлорофілу, більш висока швидкість фотосинтезу і біомаса (Huijun et al., 2009). Це свідчить про те, що гліцинбетаїн забезпечує життєво важливий захист від стресу, викликаного посухою. Зроблено висновок, що спільна експресія генів *ApGSMT2* і *ApDMT2* є ефективним підходом до підвищення абіотичної стресостійкості кукурудзи (Chunmei et al., 2013).

За допомогою вбудовування бактеріального гена *betA*, що кодує холіндегідрогеназу, були отримані солестійкі трансгенні рослини кукурудзи, в яких визначено накопичення гліцинбетаїна, що сприяє збільшенню зеленої маси у трансформантів на 80 % порівняно з контролем, вирощеному при 300 mM NaCl (Lilius et al., 1996).

Білки DREB (CBF) транскрипційного фактора мають велике значення в регуляції експресії генів і толерантності до низьких температур, посухи та сольового стресу у вищих рослин. Ген *TsCBFI* з двудольного галофіту *Thellungiella halophila* був перенесений в однодольні рослини кукурудзи. ПЛР і саузерн-блот аналіз показав, що ген *TsCBFI* був інтегрований в геном трансгенних рослин і зберігався в насіннєвих поколіннях (Shabir et al., 2016). Трансгенні рослини показали підвищену стійкість до посухи, а також більш високу врожайність зерна за посухи порівняно з нетрансгенною лінією кукурудзи. Таким чином, доведено, що ген *TsCBFI* може використовуватися для створення посухостійкої кукурудзи і для поліпшення толерантності до інших абіотичних стресів (Ning et al., 2010).

Білок транскрипційного фактора Y (*AtNF_YB1*) з *A. thaliana* покращує посухостійкість рослин. Гомологічний ген *ZmNFYB2* виявлений і у кукурудзи. Рослини з посиленою експресією цього гена демонстрували підвищену стійкість до посухи за рядом параметрів, включаючи вміст хлорофілу, стан продихів, температури листків, зниженням скручування листків і підтриманням фотосинтезу. В умовах посухи трансгенні рослини мають підвищену врожайність (Machuka et al., 2015).

Експресія мітоген-активованої протеїнкінази тютюну NPK1 індукувала оксидативний сигнальний каскад, що приводило до підвищення холодо-, жаро-, соле- та посухостійкості трансгенних рослин кукурудзи (Frame et al., 2011). На сьогодні налічується близько 15 тропічних генотипів кукурудзи, які успішно трансформовані і несуть ген стійкості до абіотичних стресових чинників. Це такі гени, як *Annexinp35*, *Annatl*, *NHX1*, *XvPrx2*, *XvSAPI*, *IPT*, *CBF1*, *ZmDREB*, *amiRNAI* і *amiRNA3* (Kovtun et al., 2000).

Лімітуючими факторами при вирощуванні кукурудзи в світі є хвороби і шкідники, які викликають втрату зерна приблизно 11 % від загального обсягу виробництва (Shou et al., 2004). Вперше гібриди кукурудзи, стійкі до різних видів шкідників, отримані за допомогою методів біотехнології, були комерціалізовані в 1996 р. в США. Генно-модифіковані рослини кукурудзи, що містять ген *Cry Vt*-токсину, отриманий з бактерії *Bacillus thuringiensis*, виявились стійкими проти деяких комах-шкідників, таких як кукурудзяний метелик, бавовняна совка та інші лускокрилі шкідники, з якими важко боротися за допомогою інсектицидів. Лінії, що містять *Vt*-токсин, зручні для захисту рослин, зниження витрат на хімічні інсектициди, а також поліпшення якості зерна (Richard et al., 2008).

Рослинна тканина складається головним чином з целюлози, геміцелюлози і лігніну. Основним природним компонентом для захисту рослин від впливу зовнішнього середовища є лігнін – природний полімер, розташований в клітинних стінках і міжклітинному просторі рослин, який скріплює целюлозні волокна (Yves et al., 2015). Результати багатьох досліджень вказують на те, що більш високий вміст лігніну зміцнює клітинну стінку, яка захищає рослинну клітину від впливу зовнішнього середовища. Кукурудза може бути уражена хворобами, спричиненими *Fusarium*, в тому числі *F. roseum*, *F. graminearum*, *F. liseola*, *F. moniliforme*, хворобами звичайної або курної сажки (*Ustilago zaeae*, *Ustilago maydis*), антракнозом (*Colletotrichum graminicola*), гельмінтоспоріозом (*Helminthosporium turcicum*), іржею (*Puccinia maydis*) і борошнистою росою (Rodriguez et al., 2009).

Показана підвищена стійкість до *Fusarium* у трансгенних рослин кукурудзи, які містять алель G2092 гена *CoAOMT2*. За даними GenBank, у кукурудзи стійкість до збудників грибних хвороб кодують 2 гени: ген *CCoAOMT1*, розташований на хромосомі 6, і ген *CCoAOMT2*, розташований на хромосомі 9 (Massimo et al., 2011). Важливе відкриття було зроблене вченими з університету Північної Кароліни, які виявили ген глутатіон-S-трансферази кукурудзи. Цей ген надає стійкість до 3-х хвороб: південної плямистості листків, сірої плямистості листків і північної плямистості листків (Milligan et al., 2012). На сьогоднішній день відомі гібридні лінії UN615 і UN6303, що мають стійкість до цих хвороб (Jorg et al., 2009).

1.2.1.2. Генетична трансформація пшениці

В останні два десятиліття спостерігається широке використання різноманітних підходів для введення екзогенної ДНК у пшеницю. Для передачі рекомбінантної ДНК у різних видів даної культури використовується декілька методичних підходів. Генетична трансформація може бути опосередкована природним біологічним вектором, наприклад, *Agrobacterium tumefaciens*, або прямою системою доставки гена (біолістична трансформація, електропорація, мікроін'єкції, лазери, Ca^{2+} -залежна трансформація в присутності поліетиленгліколю, використання волокон карбиду кремнія і наночастинок стільникового мезопористого кремнезему (MSN система)), яка використовує фізичні, електричні або хімічні засоби для доставки генів інтересу. Найбільш поширеними методами є бомбардуванням мікрочастинками і спільне кокультивування з *Agrobacterium tumefaciens* (Bhalla et al., 2006; Кваско та ін., 2020).

Поліпшення технологій *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації до середини 1990-х років привели до бажаної генетичної модифікації пшениці (Cheng et al., 1997). З початку 1990-х років докладено багато зусиль та проведено робіт з метою досягнення стабільної трансформації різних видів

цієї культури за допомогою *Agrobacterium* (Vasil, 2007; Кваско, 2020). Ченг та співавт. (Cheng et al., 1997) вперше повідомили про стабільну трансформацію пшениці методом спільного культивування з агробактерією і продемонстрували успішну передачу трансгенів в наступне покоління. Близько 35 % трансгенних рослин мали одну копію трансгена і від 1 до 5 копій були інтегровані в геном пшениці без перебудови.

У більшості експериментів з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації застосовувалась інкубація придатних експлантів з інокулюмом агробактерії. Муні і співавт. (Mooney et al., 1991) вперше показали, що поранення не є необхідним для приєднання бактерій до експлантів пшениці і повідомили про збільшення адгезії бактерій на місці поранення, викликаного механічними і ферментативними методами обробки. Чен і Дейл (Chen, Dale, 1992) повідомили про більш високу частоту інфекції апікальних меристем сухого насіння пшениці порівняно з інтактним. Махалакшмі і Хурана (Mahalakshmi, Khurana, 1995) протестували придатність різних експлантів для *Agrobacterium*-опосередкованої доставки генів і повідомили про збільшення транзйентної експресії гена *uidA* у зрілому насінні, яке піддавали механічному пораненню стиранням. Індукція *vir* генів, яка необхідна для перенесення Т-ДНК, була досягнута пораненням, а також використанням хімічних індукторів, таких як ацетосирінгон.

Agrobacterium використовується в якості надійного, ефективного і економічного вектора для доставки агрономічно важливих генів у геном пшениці. Проте використання цього методу ускладнене тим, що для його ефективного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Розробка відповідного методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, оскільки важливо розуміти ефекти усіх чинників, які впливають на доставку Т-ДНК в клітини, з яких може бути регенерована рослина. Після регенерації необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та стабільності Т-ДНК і підвищення ефективності трансформації.

Визначено декілька факторів, які впливають на ефективність Т-ДНК доставки: первинні експланти; штами *Agrobacterium*, векторні плазміди, щільність суспензії клітин *Agrobacterium*, склад живильних середовищ; умови трансформації, такі як температура і час прекультивування, інокуляції та кокультивування; наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції та кокультивуванні; антибіотики або селективні маркери, тощо (Jones et al., 2005; Bhalla et al., 2006; Hie et al., 2014; Sparks et al., 2014).

Регенерація в культурі *in vitro* є одним з найбільш важливих ключових факторів в протоколах *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. Вона значною мірою залежить від генотипу рослини, тому даний фактор є основним чинником, що впливає на ефективність трансформації. Було показано, що регенерація *in vitro* знаходиться під сильним впливом різних факторів, зокрема таких як регулятори росту рослин. Використання ауксинів, цитокінінів та поліамінів значно підвищує частоту регенерації з експлантів конкретного генотипу (Khanna, Daggard, 2003; Rashid et al., 2009). Найбільша ефективність трансформації порівняно з будь-яким іншим сортом пшениці, показана у сорту 'Bobwhite' з високою регенераційною здатністю. Цей сорт ярої пшениці був використаний у більш як 25 % робіт з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці і стає «модельним генотипом». Також для робіт з генетичної інженерії використовують такі сорти як 'Turbo' (Hess et al., 1990); 'Chinese Spring' (Langridge et al., 2002); 'Kedong 58', 'Rascal' та 'Scamp' (McCormac et al., 1998); 'Lona' (Uze et al., 2000); 'Baldus' (Amoah et al., 2001); 'Fielder' (Tao et al., 2011); 'Florida' та 'Cadenza' (Wu et al., 2003); 'Vesna' (Mitić et al., 1998); 'Veery-5' (Khanna, Daggard, 2003) та інші. В Україні для генетичної трансформації пшениці використовуються сорти 'Зимоярка', 'Подольська', 'Фаворитка', 'Смуглянка', 'Достаток', 'Володарка' (Бавол та ін., 2014; Воронова та ін., 2015; Михальська та ін., 2015; Горбатюк та ін., 2016). Крім того, для генетичної модифікації використовують деякі інші види *Triticum* такі як *T. dicoccum*

(Chugh, Khurana, 2003), *T. durum* (Patnaik, Khurana, 2003), *T. turgidum* (Wu et al., 2008).

Тип експланта є однією з основних перешкод для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці, оскільки регенерація відбувається з тканин з високою регенераційною здатністю і активним поділом клітин. Свіжовиділені, або попередньо культивовані незрілі зародки, та отриманий з них калюс були широко включені в експерименти для отримання трансгенних рослин пшениці. Першу успішну трансформацію пшениці зробив Ченг та співавт. (Cheng et al., 1997), використовуючи свіжоізольовані, попередньо прекультивовані незрілі зародки та ембріогенні калюси сорту 'Bobwhite', та отримали рослини T_1 з трансгенами *nptII* і *uidA*. Цей успіх проклав шлях для інших дослідників, що працюють з пшеницею, з використанням незрілих зародків сортів 'Veery 5' (Khanna, Daggard, 2008), 'Xinchun 9', 'PM97034', 'Yangmai 10', 'Sakha 206' (Clemente, Mitra, 2015), 'Yangmai 10' (Li et al., 2005), 'Vesna' (Mitić et al., 1998) в різних експериментах для перенесення генів інтересу. Крім м'якої пшениці, були використані як експланти незрілі зародки твердої пшениці (Wu et al., 2008), де частота трансформації коливалась від 0,6 до 9,7 %.

Порівняно з незрілими зародками, зрілі зародки розглядаються як більш зручні експланти для генетичної трансформації пшениці, оскільки вони доступні протягом всього року. Але частота регенерації у зрілих зародків багатьох сортів пшениці дуже низька, що обмежує їх використання для трансформації. Три різні сорти пшениці – 'Lunxuan 987', 'Yumai 66' і 'Bobwhite' були трансформовані з використанням штаму C58C1, при цьому частота трансформації становила 0,12–1,79 %. Зрілі зародки також були успішно використані як експланти в різних системах трансформації *T. durum* (Vishnudasan et al., 2005; Ding et al., 2009).

Також як експлант використовується апікальна меристема вегетативних або репродуктивних органів (Бавол та ін., 2014; Воронова та ін., 2015, Горбатюк та ін., 2016). Із застосуванням як експлантів апікальних

меристем пагонів 3-добових проростків, методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro* та методом *in planta*, отримано генетично модифіковані рослини м'якої пшениці з гетерологічним геном орнітин- δ -амінотрансферази (Гончарук та ін., 2015) та з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази (Воронова та ін., 2015), які характеризуються підвищеним рівнем стійкості до водного дефіциту. Ген β -1,3-глюканази був перенесений у геном пшениці для отримання стійкості до борошнистої роси, з використанням базальної частини проростків як експланта (Zhao et al., 2006).

Також були використані незрілі суцвіття, оскільки їх легше ізолювати а роботу з ними можна проводити раніше, ніж з незрілими зародками. Тим не менше, ці експланти виявилися більш генотипно специфічні до культури *in vitro* та регенерації. Інші первинні експланти були також протестовані для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці: свіжовиділені або прекультивовані зрілі зародки, а також отриманий з них калюс, суцвіття та отриманий з них калюс, і калюс, отриманий із зрілого насіння (Jones et al., 2005; Yang et al., 2008; Razzaq et al., 2011).

На початку 1990-х років трансгенні рослини пшениці були отримані шляхом інокуляції квіточок агробактерією на етапі цвітіння або близько до нього, проте вони так і не змогли продемонструвати інтеграції гена в наступних поколіннях рослин (Hess et al., 1990). Використовуючи той же протокол, але іншими штамми *Agrobacterium* і плазмідні конструкції, шляхом занурення квіток була досягнута ефективна трансформація пшениці (Sawahel, Hassan, 2002). Zale і співавт. (Zale et al., 2009) провели трансформацію на більш ранній стадії розвитку квіток. Була отримана успішна інтеграція трансгенів та їх експресія, коли в якості цільових експлантів були використані яйцеклітини.

Багато досліджень були проведені на відповідність штамів генотипам пшениці. Головним чином, тільки три штамми *Agrobacterium tumefaciens* на даний час використовуються для трансформації пшениці: LBA4404, C58C1 та

AGL1. Інші штами були використані з меншою частотою, в тому числі такі як: A281, GV3101, ABI, EHA101, EHA105, AGL0, M-21 і *A. rhizogenes* LBA9402 і Ar2626. У процесі інфікування *Agrobacterium* беруть участь кілька кодуєчих генів хромосоми, задіяних у прикріпленні бактерії до клітин рослин, та *vir* гени Ті плазміди, функція яких полягає в перенесенні, сприянні передачі та інтеграції Т-ДНК в геном рослини (Wu et al., 2008). Деякі з перерахованих штамів також містили бінарні або хелперні плазміди, які несли інші копії генів вірулентності. Також для дослідження пшениці використовують, хоча і рідко, деякі авірулентні (обеззброєні) мутантні штами *A. tumefaciens* як надійний маркер трансформації. Наприклад, Супартана і співавт. (Supartana et al., 2006) використовували мутантний штам *Agrobacterium* M-21, в якому ген *iaaM* (ген триптофанмонооксигенази, який бере участь у біосинтезі індолілоцтової кислоти) в районі Т-ДНК руйнується інсерцією транспозону 5 (Tn5). Тому, цей мутантний штам був здатний до інтеграції своїх Т-ДНК в хромосоми рослин-хазяїв, але гали не утворювалися. Трансформанти пшениці, отримані з використанням штаму M-21, як очікувалося, мали високий рівень синтезу цитокінінів (всі інші гени, в тому числі ген *ipt* – біосинтезу цитокінінів в районі Т-ДНК – були цілі і повністю функціональні), в результаті чого отримали значно змінений фенотип через гормональний дисбаланс, який може бути легко виявлений.

Штами AGL0 і AGL1 були розроблені таким чином, щоб вони містили обеззброєну Ті-плазмиду рTiBo542, яка має додаткові гени вірулентності, що походять зі штаму *Agrobacterium* A281, який у своїй онкогенній формі має широкий спектр хазяїв та індукує великі, швидко зростаючі пухлини. При використанні цих штамів частота трансформації значно вища (Khanna, Daggard, 2003). Але є деякі дослідження на пшениці, де висока частота трансформації була досягнута без гіпервірулентної плазміди (Wu et al., 2003).

Найбільш поширені штами *Agrobacterium*, які використовуються для трансформації пшениці, відносяться до гіпервірулентної групи, так само як і

обеззброєна плазмідна рTiBo542 від дикого штаму A281 *A. tumefaciens*, що має додаткові гени вірулентності, зазвичай *vir* B, C і G, які надають характер гіпервірулентності. Широко використовується дві різні конструкції, які несуть додаткові *vir* райони: зокрема плазмідна рAL155 яка є похідною від рSoup, модифікована додаванням гена *vir* G, а також ряд різних плазмід, таких як рAl154, рAL186 або рТОК233 які несуть "фрагмент Komari", що містить набір *vir* B, C і G (Wu et al., 2009; He et al., 2010).

Початкові етапи генетичної трансформації включають доставку касети гена в клітини-реципієнти з подальшим аналізом експресії гена, що доставляється. Результати вищевказаних подій можуть бути виявлені шляхом аналізу експресії репортерного гена, введеного в культуру рослинних клітин або тканин. Репортерні гени мають видимий ефект, прямо або опосередковано, за рахунок їх активності в трансформованих клітинах. За наявності протоколу для швидкого аналізу активності β -глюкуронідази, що кодується геном *uidA* від *Escherichia coli*, цей ген став найбільш широко використовуватися як маркерний в трансформації пшениці. GUS гідролізує з'єднання β -глюкуроніда з утворенням продуктів реакції, які можуть бути кількісно визначені спектрофотометрично або спектрофлуориметрично. GUS система гена-репортера є надзвичайно корисною для оптимізації параметрів генетичної трансформації у зв'язку з простою гістохімічною процедурою виявлення. Одним з основних обмежень системи даного гена-репортера є деструктивний характер його аналізу.

Синтетичний, спектрально змінений, варіант зеленого флуоресцентного білка (GFP) з медузи, *Aequorea victoria* був також використаний в якості важливого маркера в трансформації пшениці (McCormac et al., 1998). Серед інших генів-маркерів, ген люциферази від світляків *Photinus pyranus* успішно використовується в стабільній трансформації пшениці (Lonsdale et al., 1998). Ген люциферази і модифіковані версії гена *gfp* дозволяють проводити неруйнівний (прижиттєвий) аналіз експресії трансгена, легко простежити долю введених

трансгенів у зразках окремих тканин, а також сприяють швидкій оцінці і порівнянню різних процедур трансформації та надають цінну інформацію про умови, що впливають на ефективність ДНК інтеграції і стабільну експресію.

На даний момент ці репортерні гени використовуються для визначення експресії та/або інтеграції чужорідної ДНК в пшеницю. Найбільш часто використовується ген *uidA*, що кодує фермент β -глюкуронідазу (GUS); *gfp*, що кодує зелений флуоресцентний білок та ген *Lc/C1* (регулятор біосинтезу антоціанів), що призводить до накопичення антоціанів тому створює фенотип "червоної клітини" (Zale et al., 2009).

Неоднакова частота доставки ДНК в клітини різних експлантів потребувала розробки методів для ефективного відбору клітин, які несуть і експресують введені послідовності генів. Методи відбору трансформованих клітин ґрунтуються на експресії гена (селективного маркера), продукт якого надає стійкість до цитотоксичних речовини – часто антибіотика або гербіциду. Стійкість до антибіотиків та гербіцидів на сьогоднішній день є найбільш широко використовуваною селективною системою для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. Найчастіше як маркер селекції у трансформації пшениці використовується гени *bar* та *pat*. Обидва гени виділені з різних видів *Streptomyces*, кодують фосфінотрицинацетилтрансферази. Ці гени надають стійкість до фосфінотрицину і глюфосинату амонію – активним інгредієнтам гербіцидів Баста і Ліберті, відповідно (Rasco-Gaunt et al., 2001). Також в трансформації пшениці, використовується бактеріальний ген неоміцинфосфотрансферази II (*nptII*), що забезпечує стійкість до аміноглікозидів.

Гени стійкості до гербіцидів є альтернативою генам стійкості до антибіотиків і також використовуються в якості маркерів. Гени, що кодують 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), критичний фермент для біосинтезу ароматичних амінокислот, і фосфінотрицинацетилтрансферазу (PAT), забезпечують толерантність до гербіцидів гліфосату і глюфосинату,

відповідно. Ген 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтази (*cp4 epsps*), виділений зі штаму CP4 *Agrobacterium*, і ген гліфосатоксидоредуктази (*gox*) також забезпечують толерантність до гліфосату шляхом його деградації до амінометилфосфорної кислоти, і були додані до списку селективних маркерів для пшениці.

Ген гігromіцинфосфотрансфери (*hpt*) також може застосовуватися в якості ефективного селективного маркера для досягнення стабільної генетичної трансформації у пшениці (Ortiz et al., 1996). Ген *hpt* почали застосовувати, оскільки зернові більш чутливі до гігromіцину ніж до канаміцину (Rashid et al., 2010). Вікс та співавт. (Weeks et al., 2000) повідомили про використання гена ціанамідгідратази (*Cah*) в якості селективного маркера для трансформації пшениці. Останнім часом почали використовувати ген ацетолатат-синтази (*ALS*) (Ogawa et al., 2008), AtMYB12 (Gao et al., 2011), також були використаний ген *pmi* (фосфоманозоізомерази), який вважається маркером біологічної безпеки і валідований у пшениці (Stoykova, Stoeva-Popova, 2011).

Таким чином, поліпшення пшениці за рахунок генетичної трансформації має величезний потенціал для задоволення постійно зростаючого попиту. Роботи з генетичної трансформації різних видів *Triticum* проводяться в багатьох лабораторіях світу з використанням різних експлантів і бінарних векторів, промоторів і генів, що беруть участь у відповіді на біотичні і абіотичні стресові чинники. Метод трансформації, опосередкований *Agrobacterium tumefaciens*, є найвідомішим і часто використовується для розробки трансгенних рослин в основному через такі переваги, як проста інтеграція, менша трудомісткість і економічна ефективність. Останніми роками досягнуто значного прогресу в успішному застосуванні цього методу трансформації однодольних рослин. Розроблено вдосконалені методики, що обходять культивування *in vitro* в процесі трансформації.

Впровадження корисних ознак у геном пшениці шляхом генетичної трансформації. Для підвищення стійкості до різних шкідників і патогенів у пшеницю вводяться гени, що кодують оболонки вірусних білків, протигрибних білків та інгібіторів протеїназ (Shah et al., 1997; Sharma et al., 2000). Введення у пшеницю генів, що кодують хітинази з ячменю, привело до збільшення стійкості до гриба *Erysiphe graminis* (Bieri et al., 2000). Підвищує стійкість рослин пшениці до грибних патогенів також введення генів, які кодують тауматинподібний білок (Leckband, Lorz, 1998). Збільшення стійкості до ендемічного *Tilletia tritici* було досягнуто при введенні протигрибного білка, який кодується вірусом (Clausen et al., 2000). Введення генів лектинів та інгібітора протеїнази для підвищення стійкості до комах привело до гальмування їх росту на трансгенному насінні, тим самим зменшуючи плодючість їх популяції (Patnaik, Khurana, 2001).

Пряме введення невеликого числа генів за допомогою генної інженерії є швидким підходом до поліпшення толерантності рослин. Сьогоднішні інженерні стратегії полягають у передачі одного або декількох генів, які кодують або біохімічні шляхи, або кінцеві точки сигнальних шляхів. Ці генні продукти забезпечують певний захист від екологічних стресорів або безпосередньо, або опосередковано. У рослин пшениці з трансгеном *mtlD*, що кодує манітол-1-фосфатдегідрогеназу з *E. coli*, за умов осмотичного стресу, індукованому додаванням ПЕГ, спостерігалась краща адаптація до стресових умов та накопичення біомаси, яка не відрізнялась від такої в умовах без стресу (Abebe et al., 2003).

Гліцинбетаїн – це осмопротектор, який відіграє важливу роль і швидко акумулюється за умов посухи або засолення. Рослини м'якої пшениці, трансгенні за геном *betA*, який кодує холіндегідрогеназу з *E. coli*, менш потерпали від посухи порівняно з рослинами дикого типу, що проявлялось у більшій довжині корінців і кращому рості (He et al., 2011).

Трансгенні рослини твердої пшениці (*Triticum durum*), отримані на основі комерційного сорту 'Карім', що експресували A1SAP (білок, зв'язаний

зі стресом, із злака-галофіта *Aeluropus littoralis*), виявляли покращені схожість і приріст біомаси за умов засолення і осмотичного стресу. В результаті досліджень у теплиці виявлено, що *AlSAP* лінії продукували нормально виповнені зерна після довготривалих сольового або водного стресів, в той час як рослини дикого типу або гинули на вегетативній стадії за сольового стресу, або формували значно менш виповнене зерно за умов посухи (Ben-Saad et al., 2012).

Гени, що кодують пізні білки ембріогенезу (LEA), які накопичуються протягом висихання насіння, а в рослинних тканинах – коли вони відчують нестачу води, останнім часом є привабливими кандидатами при застосуванні в генетичній інженерії на посухостійкість. Трансгенний підхід був використаний для успішного впровадження в пшеницю шляхом бомбардування гена пізнього ембріогенезу ячменю *HVA1* (Sivamani et al., 2000). В цілому, це дослідження показало, що у трансгенних ліній, які експресують ген *HVA1*, покращилися характеристики росту, в тому числі збільшився вихід біомаси в умовах дефіциту води.

Австралійською компанією «Plant Biotechnologic Centre» створена посухостійка пшениця, що показала в польових випробуваннях прибавку урожаю 20 % за умов посухи, порівняно з контролем. У Китаї також створені кілька десятків ліній посухостійкої пшениці. Фірма «Monsanto» збирається до 2030 року подвоїти врожайність біотехнологічної пшениці за рахунок поліпшення засвоєння рослинами добрив, збільшення ефективності фотосинтезу, зміни архітекtonіки рослин. Нові сорти споживатимуть на третину менше прісної води, що дуже важливо при її зростаючому дефіциті.

Відзначимо, що зараз у світі відомо понад 10 000 ліній ГМ-пшениці, в тому числі з такими рідкісними генами, як ген скорпіона, який робить її посухостійкою. Зараз випробовується понад 500 ліній ГМ-пшениці, стійких до фузаріозу колоса, вірусу смугастої мозаїки листків, борошнистої роси, попелиці, клопа-черепашки, гербіциду біалафосу, водного дефіциту і засолення, низьких температур, посухи.

Пшениця з високим вмістом білка є важливим джерелом рослинного протеїну в раціоні людини. Однією із задач застосування трансгенних технологій для поліпшення поживної цінності пшениці є підвищення якості зерна шляхом: 1) збільшення вмісту білка; 2) збільшення вмісту незамінних амінокислот, таких як лізин; 3) збільшення вмісту високомолекулярних глютенінів для поліпшення хлібопекарських властивостей пшеничного борошна; 4) модифікація крохмальної композиції і об'єму; 5) виробництво фармацевтичної продукції та нутрицевтиків.

Генетична трансформація пшениці є ключовим компонентом у схемі, що пропонує повний набір підходів до застосування біотехнології для поліпшення якості пшениці за допомогою прямого введення генів високомолекулярних глютенінів (Vasil, 2000). *Glu1A α* ген, що пов'язаний з високою якістю випічки хліба, був введений в сорт Bobwhite, позбавлений цього гена, і його стабільність підтримувалася протягом кількох поколінь на високому рівні (Altpeter et al., 1996). Трансформація одним або двома генами субодиниць високомолекулярних глютенінів приводить до ступінчастого їх збільшення та зміни полімерної збірки і композиції клейковини. Крім того, надекспресія високомолекулярної субодиниці *Glu1D α 5* в трансгенній пшениці (*T. aestivum*) привела до чотирикратного збільшення цієї частки компонента білка насіння, а також до відповідного збільшення пропорції загального білка і глютенінів (Rooke et al., 1990). Ця робота також продемонструвала збільшення еластичності тіста.

Дослідження щодо підвищення якості були поширені на твердих сортах пшениці, введенням одного або двох генів субодиниць високомолекулярних глютенінів з X і Y типом (*Glu1A α 1* або *Glu1D α 5*) (He et al., 1999). Аналіз експресії додаткових субодиниць в T₂ поколінні трансгенних рослин з використанням міксографа виявив збільшення міцності тіста.

Модифікацією пшеничного крохмалю на даний час займаються в різних лабораторіях для поліпшення його потенційної корисності. Зерно пшениці переважно складається з крохмалю, який являє собою суміш з двох

полімерів – майже лінійних молекул амілози і сильно розгалужених молекул амілопектину. Співвідношення амілози і амілопектину в крохмалі визначає його фізико-хімічні характеристики і тим самим його кінцеве використання. Бажано мати шеничне борошно з низьким вмістом амілози, оскільки це поліпшує текстуру локшини. Вчені працюють у напрямі збільшення вмісту амілопектину в крохмалі тим самим зменшуючи вміст амілози (Baga et al., 2000). Для підвищення рівня каротиноїдів у зерні була створена трансгенна елітна пшениця, в ендоспермі якої експресується ген фітоенсинтази кукурудзи (Cong et al., 2009).

Зниження завдяки РНК-інтерференції експресії ферменту, необхідного для фосфорилування крохмалю, під контролем ендосперм-специфічного промотора приводило до зменшення вмісту фосфорильованого крохмалю у м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) (Ral et al., 2012). Це супроводжувалось збільшенням вегетативної маси, розміру зернин і врожаю зерна до 29 % у наступних поколіннях, вирощених як в теплиці, так і за польових умов.

З метою поліпшення засвоєння зерна тваринами, а також для поліпшення біодоступності фосфату і мінералів, була створена трансгенна пшениця, що експресує в ендоспермі ендоксиланазу з *Bacillus subtilis* і естеразу ферулової кислоти з *Aspergillus niger* (Brinch-Pederson et al., 2000).

Пшениця також ідеальна система для виробництва нових сполук через чудові властивості зберігання та існування ефективної переробної промисловості. Потенційні продукти включають в себе біологічно активні білки і пептиди. Повідомлялося про отримання рекомбінантних антитіл у пшениці з медично важливими, одноланцюжковими рекомбінантними антитілами проти раково-ембріонального антигена (Stoger et al., 2004). Рекомбінантні антитіла були виявлені в листках і насінні. Що ще більш важливо, рекомбінантні антитіла залишалися активними після тривалого зберігання насіння при кімнатній температурі, таким чином відкриваючи можливості подальшого використання пшениці для виробництва нових сполук.

Отримання гібридів є важливим компонентом програм селекції сільськогосподарських культур. Розвиток відповідної системи гібридизації пшениці вимагає високого ступеня чоловічої стерильності у всіх частинах жіночого компоненту, щоб уникнути самозапилення. Розроблено систему ядерної чоловічої стерильності пшениці шляхом введення гена барнази під контролем промотора тапетума (De Block et al., 1997). Експресія гена барнази на конкретній стадії розвитку пиляків руйнує тапетум, тим самим запобігаючи нормальному розвитку пилку і викликає його стерильність. Ця система використовує інгібітор рибонуклеази *барстар* гена, відновлюючи фертильність чоловічостерильних рослин.

Генетична трансформація залишиться важливим інструментом для розуміння функцій генів і для тестування корисності нових послідовностей. Новітні інструменти біотехнології не тільки мають потенціал для збільшення ефективності та результативності селекційних програм пшениці, а й мають дати інформацію про генетичний контроль ключових ознак, які будуть використовуватися для генетичних маніпуляцій.

1.3. Використання ДНК-маркерів в селекції рослин

1.3.1. IRAP-маркери для генотипування сільськогосподарських культур

Ретротранспозони є одними з найпоширеніших геномних компонентів, кількість яких сильно варіює протягом відносно короткого еволюційного часу, та являють собою основний компонент структурної еволюції рослинних геномів (Kalendar et al., 2011; Yilmaz et al., 2014; Mandoulakani et al., 2015; Bayram et al., 2012; Bento et al., 2013; Trebichalský et al., 2012). Вони є однією з двох груп транспозабельних елементів (TE) в еукаріотичних геномах і визначаються відповідно до характеру їх поширення. Ретротранспозони належать до класу I TE і переміщуються за допомогою РНК проміжного продукту на відміну від інших транспозонів (клас II), які не мають РНК проміжного продукту. Ретротранспозони поділяються на два головні

субкласи, що відрізняються за структурою та циклом переміщення: LTR ретротранспозони та non-LTR ретротранспозони (LINE та SINE), які різняться відповідно наявністю або відсутністю довгих термінальних повторів (LTR) на їх кінцях (Kalendar et al., 2011). LTR ретротранспозон обмежується довгими термінальними повторами, які містять транскрипційний промотор, що пізнається ядерними факторами ініціалізації транскрипції для синтезу РНК-полімеразами II і III, та термінатор (Kalendar et al., 2011; Хапилина, Райзер, 2013).

Зворотна транскрипція починається в доменах PBS і PPT, відповідно для (–) і (+) ланцюгів кДНК. Внутрішня область кодує білки, необхідні для життєвого циклу ретротранспозона: білок капсида (GAG), аспарагінову протеїназу (AP), яка розщеплює поліпротеїн (AP); інтегразу (IN), яка вставляє копію кДНК в геном; зворотну транскриптазу (RT) і РНКазу Н (RN), які разом скопіюють транскрипт в кДНК. Внутрішня область містить еволюційно консервативні домени, необхідні для функцій, які можуть бути використані для виділення ретротранспозонів з раніше невивчених видів рослин. LTR, як правило, консервативні в середині сімейств, і можуть служити для розробки праймерів для створення футпринтів ДНК (Kalendar et al., 2011).

LTR ретротранспозони транскрибуються з одного LTR інтегрованого елемента, щоб виробити майже повну довжину копії РНК, яка містить одну копію LTR, розділену між його двома кінцями (LTR забезпечує стартовий сайт і сигнал поліаденілювання для елемента). Ця РНК потім піддається зворотній транскрипції в екстрахромосомну кДНК, відтворюючи повну довжину елемента, який в кінцевому рахунку, інтегрується назад в геном. Водночас внутрішня частина до LTR є праймальними ділянками для зворотної транскрипції. Велика центральна частина ретротранспозону кодує структурні компоненти вірусоподібної частинки, в яку вставлена РНК разом із зворотною транскриптазою й інтегразою (Kalendar et al., 2011).

Загальні структурні особливості, а також основні етапи життєвого циклу виокремлюють ретротранспозони і ретровіруси. На відміну від ретровірусів, ретротранспозони вставляють нові копії тільки у геном хазяїна. Якщо інтеграція відбувається всередині клітинної лінії, з якої в кінцевому рахунку індукується рослина, отримується пилок або яйцеклітини, то новий поліморфізм буде вносити свій вклад в генетичний пул. Ці нові копії можна ефективно детектувати з метою розрізнення селекційних ліній, сортів, або популяції рослин один від одного (Kalendar, 2011; Bublyk et al., 2013).

У рослинах LTR ретротранспозони, як правило, більш численні і активні, порівняно з non-LTR. У багатьох культурних рослин 40-70 % загальної ДНК складається з LTR ретротранспозонів. Така велика кількість, загальна дисперсія, і активність робить їх ідеальними джерелами для розробки молекулярних маркерів (Kalendar et al., 2011). Більшість методів на основі ретротранспозонів не базуються на знанні їх локалізації в геномі, а відтворюють фінгерпринти з мультиплексних сайтів вставок ретротранспозону в геномі. Всі вони використовують поєднання відомої послідовності ретротранспозону і безліч суміжних послідовностей. Праймери, як правило, створюються відповідно до довгих термінальних повторів – в областях, які консервативні всередині сімейства, але які різняться між родинами. Хоча регіони, внутрішні відносно до LTR, які також містять консервативні сегменти, можуть бути використані для цієї мети, як правило, для LTR вибираються так, щоб звести до мінімуму розмір мішені, що підлягає ампліфікації. Оскільки LTR є прямими повторами, праймер назовні з лівого боку або 5' LTR обов'язково застромиться всередину з правого боку, або 3' LTR (Kalendar, 2011).

SSAP, IRAP і REMAP є мультилокусними маркерами, орієнтованими на аналіз фрагментів ДНК з неідентифікованою локалізацією в геномі (Сиволап и др., 2011; Kalendar et al., 2011; Степанов и др., 2014). Метод SSAP дозволяє аналізувати послідовності між сайтом вставки ретротранспозону і сайтом рестрикції, до якого приєднується специфічний адаптер (Степанов и

др., 2014). Праймери, що використовуються для ампліфікації, відповідають адаптеру (пустотілий квадратик на рис. 1.1, а) і ретротранспозону (LTR) (Kalendar et al., 2011).

У IRAP аналізуються області розташовані між вставками ретротранспозонів (Kalendar et al., 2011; Степанов и др., 2014). Ампліфікація проходить між ретротранспозонами (лівий і правий прямокутники LTR на рис. 1.1, б), які розташовані поблизу один від одного в геномі, з використанням праймерів до ретротранспозонів. Елементи, показані на рис. 1.1, орієнтовані голова-до-голови, з використанням одного праймера (Kalendar, 2011).

Метод REMAP оцінює поліморфізм областей, локалізованих між ретротранспозонними вставками і найближчими мікросателітами (Сиволап и др., 2011; Kalendar et al., 2011; Степанов и др., 2014).

RBIP маркери, на відміну від вище перерахованих маркерних систем, дозволяють визначити наявність ретротранспозонних вставок в конкретному локусі. Ампліфікація відбувається між доменом мікросателіту (вертикальні стовпчики на рис. 1.1, с) і ретротранспозоном, з використанням праймера, зчепленого з проксимальною стороною мікросателіту і праймером до ретротранспозону (Kalendar et al., 2011).

Метод RBIP аналізує, подібно до SSR-маркерів, поодинокі специфічні локуси з відомим місцем розташування (рис. 1.1, d). Для даних маркерних систем характерний широкий вибір підходів до детектування продуктів ПЛР: проведення електрофорезу в агарозному і поліакриламідному гелі, використання капілярного електрофорезу і мікрочіпів. Таким чином, застосування ДНК-маркерів, заснованих на поліморфізмі ретротранспозонних вставок, є перспективним у вивченні філогенії і генетичного різноманіття (Kalendar, 2011).

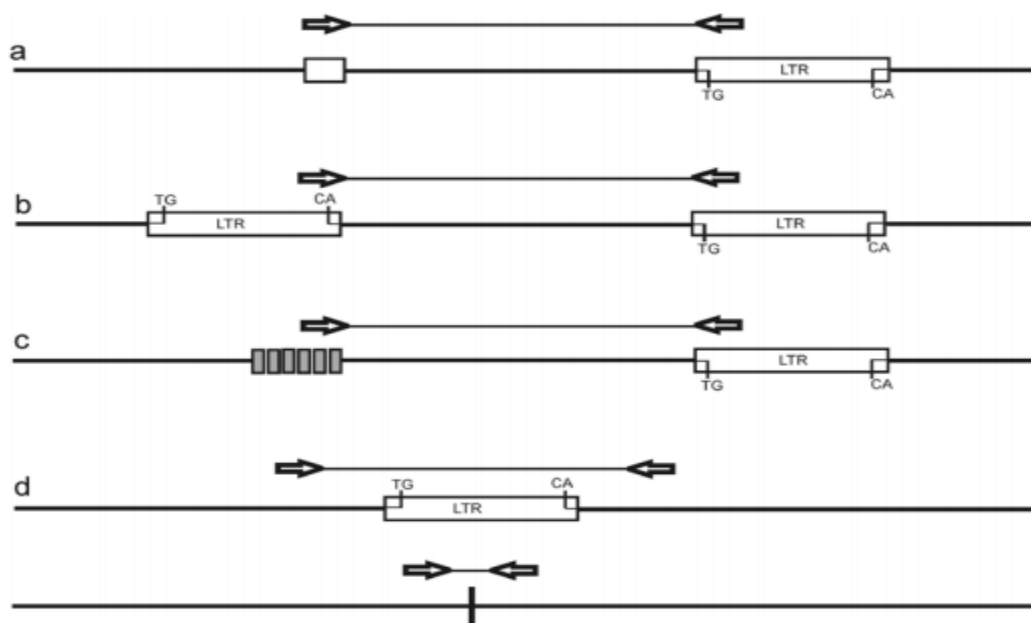


Рис. 1.1. Методи використання ретротранспозонів як молекулярних маркерів: **a** – SSAP; **b** – IRAP; **c** – REMAP; **d** – RBIP (Степанов и др., 2014).

IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polimorphism) – метод ампліфікації геномної ДНК між прилеглими послідовностями ретротранспозонів. Продукт ПЛР-ампліфікації геномної ДНК є стабільним генетичним IRAP-маркером. Поліморфізм в даному випадку зумовлений або мутацією в ділянці зв'язування праймера, або унікальним біологічним процесом – ретротранспозицією, в результаті вбудовування ретротранспозону в нову ділянку геномної ДНК без втрати початкової ділянки (рис. 1.2) (Хапилина, Райзер 2013; Степанов и др., 2014). До основних переваг цього методу аналізу генома відносяться інформативність, здатність виявляти поліморфізм на внутрішньо- і міжвидовому рівнях, і при цьому – відносна простота виконання, висока відтворюваність і економічність (Boronnikova, Kalendar, 2010).

IRAP (Inter-Retotransposon Amplified Polymorphism)

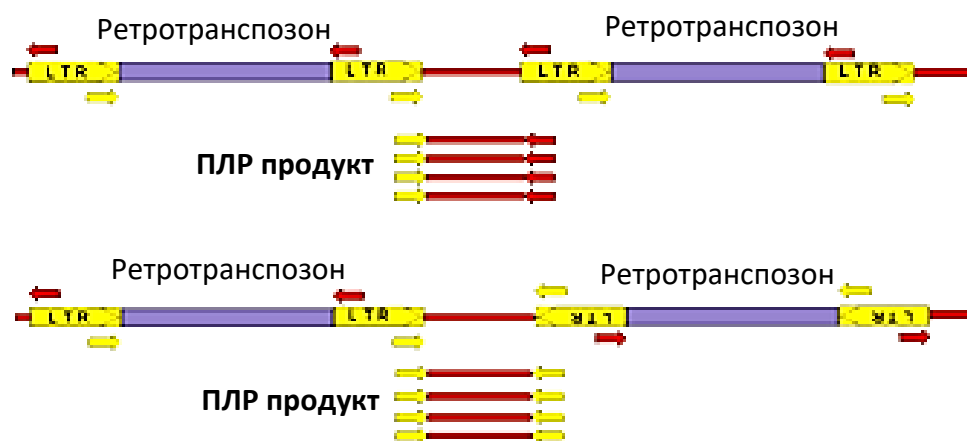


Рис. 1.2. Схематичне зображення IRAP-аналізу (Kalendar, 2011).

Це пов'язано з тим, що ретротранспозони розсіяні по всьому геному, включаючи теломерні і центромерні ділянки хромосом, які кодують і гетерохроматин. Оскільки послідовності ретротранспозонів беруть участь у рекомбінації в мейозі, вони можуть бути ефективно використані для виявлення внутрішньовидових генетичних відмінностей між лініями, сортами і популяціями, а також для близьких видів, наприклад, інших злакових, що надзвичайно розширює можливості спрямованої селекції рослин. Методи IRAP і REMAP можуть використовуватися одночасно як на м'якій пшениці, так і на інших її видах, а також на ячмені, житі та вівсі (Хапилина, Райзер, 2013; Boronnikova, Kalendar, 2010).

Важливим моментом є й те, що активація ретроелементів у рослинному геномі відбувається під впливом різних стресів – зневоднення, низьких або високих температур, впливу фітопатогенів, а також у відповідь на введення в культуру *in vitro*. У деяких дослідженнях показано, що ретротранспозиція є найбільш імовірною причиною соматичної мінливості, індукованої культивуванням *in vitro* (Хапилина, Райзер, 2013; Campbell et al., 2011).

Маркерні системи, засновані на поліморфізмі ретротранспозонів, були використані для ідентифікації та паспортизації різних рослин. Зокрема, розроблено молекулярно-генетичні паспорти для природних популяцій *Adonis vernalis*. Автори пропонують наступні етапи паспортизації: вибір

ефективних стабільних молекулярних маркерів; збір матеріалу; підбір ефективних праймерів і проведення молекулярно-генетичного аналізу з використанням ПЛР; аналіз виявлених IRAP-маркерів і визначення ідентифікаційних (мономорфних і поліморфних маркерів), а також складання молекулярно-генетичної формули, штрих-коду і генетичного паспорту (Хапилина, Райзер, 2013).

Технологія молекулярно-генетичної ідентифікації та сертифікації з використанням ретротранспозонів була апробована на чотирьох популяціях рідкісного реліктового виду *Adenophora lilifolia* (L.) A. DC. Молекулярно-генетичний аналіз, проведений з використанням ISSR- і IRAP-маркерів, на основі ПЛР дозволив виявити поєднання специфічних фрагментів ДНК. Складено молекулярно-генетичні формули, штрих-коди і генетичні паспорти популяцій (Хапилина, Райзер 2013; Боронникова, Нечаева, 2012).

1.3.2. Застосування ДНК-маркерів у практичній селекції

Молекулярно-генетичні маркери в загальному випадку є кодуючою або некодуючою послідовністю ДНК з відомою локалізацією на хромосомі. Вони дозволяють проводити аналіз геному на рівні ДНК. На даний час існує численна кількість методів аналізу поліморфізму ДНК і безліч комбінацій даних методів, що ускладнює створення єдиної докладної класифікації ДНК-маркерів. Молекулярні маркери часто класифікують за методами, на яких базується підхід до їх аналізу, та на типах послідовностей, які входять до їх складу (Хлесткина, 2011). Для вивчення рослинного геному використовують RAPD-, ISSR-, RFLP-, CAPS-, STS-, SCAR-, AFLP-, SSAP-, SSR- та SNP-маркери (Bornet, Branchard, 2012; Хлесткина, 2013). Крім того, маркери поділяються на монолокусні та мультилокусні. Монолокусні маркери успадковуються, як правило, за кодомінантним типом, мультилокусні – за домінантним (Landjeva et al., 2007).

Впровадження в селекційні програми сучасних біотехнологічних підходів, заснованих на використанні молекулярних маркерів, може сприяти вирішенню низки проблем. Одним з таких підходів, які набули розвитку, є маркер-допоміжна селекція (MAS, marker-assisted selection), яка використовується в селекційних програмах економічно розвинених країн в якості методичного прийому для інтенсифікації селекційних процесів (Леонова, 2013; Xu et al., 2013).

За допомогою ДНК-маркерів ідентифіковано і картовано значну кількість генів і локусів, які контролюють стійкість до біотичних та абіотичних стресових чинників, а також врожайність та якість зерна у різних видів злаків (Kalendar et al., 2011). Однак, незважаючи на величезний потенціал ДНК-маркерів, які можна використовувати в «непрямій» селекції господарсько-важливих ознак, впровадження цих нових технологій у практику відбувається повільними темпами.

В останні роки спостерігається тенденція більш широкого використання спрямованих функціональних маркерів (Gupta, 2004). Це пов'язано з появою відкритих геномних баз даних (Australian wheat/barley molecular marker program; GrainGenes: a database for *Triticeae* and *Avena*, SoyBase and the Soybean breeder's toolbox. Integrating genetics and molecular biology of soybean researchers; The barley genome database at Washington State University; TIGR Solanaceae Genomics Resource. Solanaceae Functional Genomics) та відносно простих методів пошуку і розробки маркерів, які розташовані в межах або поблизу цільового гена (Andersen, Lübberstedt, 2003).

Функціональні маркери (ФМ) розробляються на основі нуклеотидних послідовностей гена. Тому ФМ дозволяють не тільки виявляти дану послідовність в геномі, але і розрізняти її алельні варіанти. ФМ базуються на поліморфних послідовностях і дозволяють контролювати фенотипічний прояв ознаки (Andersen, Lübberstedt, 2003).

Важливо, що не кожен ген-спрямований маркер (ГСМ) є функціональним маркером, оскільки не кожен ГСМ може виявляти фенотипічну варіацію ознаки (Poczai et al., 2013). ГСМ можуть також визначати ділянки цільових послідовностей, які не транскрибуються (Arnholdt-Schmitt, 2005; Varshney et al., 2007). Останнім часом було розроблено багато нових маркерних систем ген-спрямованого типу, які потенційно можуть стати функціональними маркерами. Діагностична цінність решти класів ДНК-маркерів, розроблених для генетично нейтральних ділянок геному, залежить від ряду факторів. Тому тільки частина маркерів, розроблених для діагностики генів у конкретних популяціях, широко застосовується в практичній селекції (Poczai et al., 2013).

Основний принцип MAS полягає в ідентифікації тісного зчеплення між маркером і геном, який контролює ознаку, та використанні асоціацій маркер-ознака в практичних цілях для створення нових сортів і селекційних ліній. Після того, як асоціації маркер-ознака встановлені, створення нових генотипів може йти із залученням традиційних методів селекції (схрещування, бекросування, самозапилення і добір). MAS як методичний підхід використовується в селекції для вирішення ряду завдань (Arnholdt-Schmitt, 2005; Varshney et al., 2007).

Маркер-асоційована селекція має ряд переваг порівняно із селекцією за фенотипічними ознаками. Так, аналіз ДНК можна проводити в лабораторних умовах на будь-якій стадії розвитку – від насіння до дорослої рослини. Крім того, відсутня необхідність проведення фенотипічної оцінки в польових умовах в певний час року, в певному регіоні. У разі створення стійких сортів немає необхідності мати і постійно підтримувати раси патогенів та тестерні лінії з генами резистентності. Проте, у деяких випадках наявність молекулярного маркера у генотипі не означає, що рослину не потрібно аналізувати у польових умовах за фенотипічними ознаками (Marone et al., 2012; Basu et al., 2013).

Маркерні технології доцільно використовувати у «непрямій» селекції ознак, які важко фенотипуються, або вартість фенотипічного аналізу є високою; ознак, на прояв яких істотно впливає навколишнє середовище, ознак з мультигенним контролем. Для генів стійкості до патогенів можуть існувати обмеження щодо карантину або відсутній набір рас патогена для проведення фенотипічної оцінки. У деяких випадках фенотипічна оцінка може призводити до загибелі рослин.

Молекулярні маркери є корисними для контролю інтрогресії генетичного матеріалу донора і цілісності фрагмента донорського геному, виявлення і підтримки в популяції бажаних алелів генів (Landjeva et al., 2007). Селекційні програми з залученням технологій MAS рекомендується проводити у три стадії: селекція «цільового локусу», рекомбінантна селекція і аналіз геному рекурентних батьків («background selection») (Леонова, 2013).

Проведено комп'ютерне моделювання з подальшим практичним підтвердженням різних стратегій MAS, що враховує число інтрогресованих генів, їх домінантний або рецесивний стан (Herzoa, Frisch, 2011). В цих роботах зазначено, що необхідно враховувати число бекросів, розмір аналізованої популяції і число маркерів у аналізі для побудови оптимальної стратегії MAS. Бекросні стратегії MAS використовуються для створення бібліотек ізогенних та інтрогресивних ліній і інтрогресії ознак з мультигенним контролем (Falke et al., 2009).

Перш, ніж молекулярний маркер буде використаний в практичних цілях для детекції ознаки, він має пройти шлях від виявлення асоціацій маркер-ознака до валідації. Валідація – це тестування здатності ДНК-маркерів прогнозувати фенотип на широкому наборі сортів, ізогенних ліній, популяцій, в різному генетичному оточенні і в різних умовах навколишнього середовища. За даними (Falke et al., 2009), для результативного використання маркерів в програмах MAS необхідні кілька ключових компонентів, а саме: надійні генетичні маркери, насичені молекулярні карти і наявність встановлених асоціацій «маркер-ознака».

«Ідеальні» маркери повинні мати певні властивості і відповідати ряду вимог: можливість ідентифікації фенотипічних проявів алельних варіантів для ідентифікації у різних особин; фенотипічна відмінність алелів одного локусу від алелів інших локусів; поліморфність; рівномірність локалізації в геномі; простота виявлення, відтворюваність, дешевизна; можливість автоматизації виявлення; кодомінантність (Бадаєва, Салина, 2013).

Методи виявлення асоціацій «маркер-ознака» базуються на молекулярно-генетичних картах, побудованих за результатами схрещування батьківських форм, контрастних за досліджуваною ознакою. Ефективність MAS, головним чином, залежить від ступеня зчеплення маркера з ознакою і від рівня насичення молекулярно-генетичних карт. Для виявлення асоціації «маркер-ознака» необхідні мінімум три маркера: один має косегрегувати з ознакою і використовується в основному на стадії селекції «цільового локусу», два інших маркера мають фланкувати фрагмент донорського геному і бути ефективними на етапі рекомбінантної селекції (Хлесткина, Салина, 2006). Проте, виявлення зчеплення «маркер-ознака» на конкретній картованій популяції не означає ефективність даного маркера для іншого селекційного матеріалу. У багатьох випадках результати картування, отримані на специфічних популяціях, необхідно перевіряти за допомогою інших схрещувань, особливо, якщо ознака має кількісне успадкування.

Незважаючи на постійне вдосконалення методів маркування ДНК і величезний потенціал MAS, практичне застосування молекулярних маркерів для створення комерційних сортів пшениці досі має обмежений характер. До однієї з головних причин можна віднести високу вартість MAS. Вартість технологій молекулярного маркування з часом знижується, проте витрати для проведення деяких етапів MAS потребують значних грошових інвестицій (Ху, 2010).

На інтеграцію сучасних молекулярно-генетичних методів у класичну селекцію, окрім фінансових витрат, впливають і додаткові фактори, такі як точність картування генів/QTLs і відсутність тісного зчеплення ген-ознака,

що призводить до необхідності перевіряти асоціації «маркер-ознака» на декількох картованих популяціях; необхідність валідації маркера для доказу його надійності при виявленні генів/QTLs для великої кількості зразків і в різному генетичному оточенні; відсутність достатньої кількості поліморфних і кодомінантних маркерів для тестування селекційного матеріалу, що є важливим як в схрещуваннях між близькими сортами, так і для віддаленої гібридизації; складність інтрогресії «мінорних» QTLs для ознак з мультигенним контролем, на які істотно впливають навколишнє середовище та епістатичні взаємодії; людський фактор – вимагає наявності в організаціях, що займаються практичною селекцією, кваліфікованого персоналу, який володіє сучасними молекулярними методами аналізу генома рослин і статистичними програмами для картування генів/QTLs. До того ж, методичні основи класичної селекції не завжди знайомі фахівцям, які працюють в галузі молекулярної біології. На сьогодні, ефективним і раціональним інструментом MAS селекції є полімеразна ланцюгова реакція (Delannay et al., 2012).

Отже, виходячи з літературних даних, молекулярні маркери широко впроваджуються в усьому світі для полегшення складних процесів контролю перенесення цінних генів у різноманітних селекційних та дослідницьких програмах. Існує широкий перелік молекулярних маркерів, які засновані на різноманітних поліморфних послідовностях, та мають різний базовий метод визначення поліморфізму. Проте, для використання у прикладній селекції рекомендується застосування спрямованих функціональних маркерів, які є більш зручними та точними у роботі.

1.4. Генетичні системи, які контролюють якість зерна м'якої пшениці

Пшениця забезпечує приблизно одну п'яту від загального калорійного раціону населення всього світу. На даний момент, близько 95 % пшениці, що вирощується у світі, це – гексаплоїдна м'яка пшениця (*Triticum aestivum*),

інші 5 % становить тетраплоїдна тверда пшениця (*Triticum durum*) (Žilić et al., 2011).

Багатофункціональність та незамінність пшеничного борошна зумовлена особливістю структури білків та їх кількістю. Білковий комплекс пшениці складається з гліадинів, глютенінів, альбумінів і глобулінів. Більша частина пшеничного зерна – запасні білки гліадини і глютеніни, становлять 80-85 % загального вмісту білка в зерні. Альбуміни і глобуліни – це структурні і ферментні білки алейронового шару і зародка (Тарасюк, Починок, 2015). Запасні білки чинять основний вплив на якість клейковини. Глютеніни здатні до полімеризації шляхом утворення інтермолекулярних -S-S-зв'язків, що формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за еластичність та пружність тіста (Атабаева, Массино, 2005). Гліадини істотно впливають на фізичні показники тіста, такі як його в'язкість і, особливо, розтяжність (Kasarda et al., 1976).

Відомі три основні генетичні системи, які контролюють хлібопекарську якість м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. Це – гени *Glu*, які визначають компонентний склад високомолекулярних і низькомолекулярних запасних білків глютенінів; гени *Gli*, що кодують спирторозчинні білки гліадини, і локус *Ha*, що детермінує консистенцію ендосперму (Попереля, 1996).

На даний час відомо 7 основних гліадинкодуєчих локусів (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* і *Gli-3* (*Gli-A3*)), а також 4 додаткових локуси (*Gli-A5*, *Gli-B5*, *Gli-6* (*Gli-A6*), *Gli-7* (*Gli-D7*)), які тісно зчеплені з основними (McIntosh et al., 2013). Описано 4 локуси, що кодують низькомолекулярні субодиниці глютенінів (*Glu-B2*, *Glu-A3*, *Glu-B3* і *Glu-D3*) і 3 локуси високомолекулярних глютенінів (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*) (Payne et al., 1984).

Серед сортів озимої м'якої пшениці, внесених до Державного реєстру сортів рослин України, переважає сильна і цінна пшениця, на частку кожної з них припадає близько третини сортів, п'яту частину становлять сорти-філери, і найменша кількість сортів віднесена до групи кормових, фуражних

пшениць. У групі сортів сильних пшениць за частотою виділяється алель *Gli-1A(4)* – 68 %, і при погіршенні якості зерна зустрічальність цього алеля помітно знижується при одночасному збільшенні у філерів і кормових пшениць частки алелів *Gli-1A(2)*, *Gli-1A(3)* і *Gli-1A(9)*.

За локусом *Gli-1B* практично всі сорти сильних пшениць мають тільки один алель – *Gli-1B(1)*. З погіршенням якості спостерігається різке зниження частоти розповсюдженості цього алеля, і домінує алель *Gli-1B(3)*. У локусі *Gli-1D* у високоякісних пшениць поширені алелі *Gli-1D(4)*, *Gli-1D(5)*, *Gli-1D(7)*, *Gli-1D(10)*, які зустрічаються у 77,8 % сортів сильних пшениць, при цьому домінує алель *Gli-1D(4)* (44,4 %) (Тищенко и др., 2005).

Сильний вплив на якість борошна пшениці мають алелі локусу *Glu-D1*, за ним йдуть алелі локусів *Glu-B1* і *Glu-A1* (Boisson et al., 2005). Алельні варіанти високомолекулярних глютенінів *Glu-1A(1)*, *Glu-1A(2*)*, *Glu-1B(7+8)*, *Glu-1B(77+8)*, *Glu-1D(5+10)* визначають високі показники якості зерна та хлібопекарські властивості пшениці (Панченко и др., 2007).

Таким чином, необхідною умовою створення сильної хлібопекарської пшениці є присутність в генотипі сорту таких алелів гліадинкодуєчих та глютенінкодуєчих локусів як *Gli-1A(4)*, *Gli-1B(1)*, *Gli-1D(4)* та *Glu-1A(2*)*, *Glu-1B(77+8)*, *Glu-1D(5+10)*. Отже, контроль алелів запасних білків – це один із важливих етапів відбору гібридних сімей.

Вміст білка є важливою характеристикою оцінки якості зерна, яке нормується ДСТУ (“ДСТУ 3768:2010. Пшениця. Технічні умови” 2010). Відповідно до державного стандарту пшениця 1-го класу повинна містити білка в зерні не менше 14 %, а 2-го класу – не менше 12,5 %. Проте в останні десятиріччя, на противагу зростанню врожайності, якість зерна погіршується, включно з показником вмісту білка. Складність підвищення у зерні вмісту білка зумовлена високим екзогенним ефектом у взаємодії з комплексом генетичних систем, що регулюють дану властивість (Simmonds, 1995).

Вміст мікроелементів у зернішках пшениці на нормальному рівні, тобто такому, що не перевищує вимог стандарту ДСТУ 3768:2010, є важливим

фактором для харчування людини та отримання насіння культури з високими посівними якостями. Низький рівень вмісту Zn, Fe й Mn у ґрунтах і сільськогосподарських культурах зустрічається у всіх країнах та особливо небезпечний в регіонах вирощування зернових культур, де вони є основою харчування людини. Проблема нестачі біологічно важливих мікроелементів, таких як Fe і Zn, є актуальною для понад двох мільярдів людей в усьому світі, але найбільше від їх дефіциту страждають вагітні жінки та діти віком до 5 років (Моргун та ін., 2010; Gernand et al., 2016; White, Broadley, 2009; World Health Organization, 2019).

Таким чином, харчова цінність сучасних високоврожайних пшениць набуває ключового значення. Вміст мікроелементів в зерні пшениці детермінується генетично та залежить від чинників навколишнього середовища. Однією із стратегій генетичного поліпшення сучасних сортів щодо підвищеного вмісту мікроелементів є перенесення генів від диких родичів пшениці, таких, наприклад, як спельта, полба, тощо (Jorpa et al., 1997; Velu et al., 2014).

Нещодавно було показано, що ген *Gpc-B1* з лінії FA15-3 дикої тетраплоїдної полби (*T. turgidum* var. *dicoccoides*) Ізраїлю кодує фактор транскрипції, який прискорює фізіологічне старіння у вегетативних частинах рослини, що у свою чергу приводить до мобілізації і відтоку в зерно азоту, заліза, цинку (Uauy et al., 2006; Rybalka та ін., 2018). Цей ген був картований на хромосомі 6В і шляхом численних схрещувань в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України перенесений в озиму гексаплоїдну пшеницю (Похилько та ін., 2016). Проте, прояв цільової ознаки у новому генетичному оточенні комерційно привабливих ліній для різних кліматичних зон України залишається все ще під питанням.

Консистенція ендосперму зернівки. Твердозерна пшениця є цінною для хлібопекарської промисловості тому, що під час помолу утворюється велика кількість пошкоджених гранул крохмалю, що приводить до більшого поглинання та утримання води, забезпечуючи ефективніший підйом тіста.

Ендосперм м'язозерної пшениці є більш крихким і потребує менших зусиль при розмелюванні. Борошно формується з меншими розмірами частинок і з великим вмістом непошкоджених крохмальних гранул. Воно слабкіше поглинає воду, і тому технологічно більш підходить для випікання печива та бісквітів, ніж булочок, здоби (Mohammadi et al., 2013).

Твердозерність ядра зерна є результатом взаємодії ліпід-зв'язуючих білків пуринодолінів, багатих на цистеїн і триптофан, які взаємодіють з ліпідами на поверхні гранул крохмалю. Текстура ендосперму контролюється кількома зчепленими генами, розміщеними на короткому плечі хромосоми 5D у локусі *Ha* (*Hardness*). Гени кодують три поліпептиди, які складають білок фріабілін: пуринодолін *a* (ген *Pina-D1*), пуринодолін *b* (ген *Pinb-D1*) та Grain Softness Protein (ген *Gsp-1*) (Beecher et al., 2002; Martin et al., 2006; Lillemo et al., 2006). Градація технологічно важливої ознаки твердозерності м'якої пшениці значною мірою зумовлена комбінаціями алелів пуринодолінових генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*.

Текстура ендосперму є критичною характеристикою якості пшениці *Triticum aestivum* L. За ознакою «hardness» сорти м'якої пшениці можна поділити на твердозерні («hard») та м'язозерні («soft») (Чеботар et al., 2012). Найбільш широко для оцінки текстури пшеничного зерна використовуються методи визначення індексу розміру частинок (particle size index, PSI), інфрачервоної спектроскопії в близькому діапазоні (near infrared spectroscopy, NIRS), Single Kernel Characterization System 4100 (SKCS), індекс відлущування (pearling index), електрофорез білків у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) та ПЛР маркери (Pasha et al., 2010).

Твердість зернівок пшениці визначається переважно генетичними факторами, проте вплив мають також кількість вологи, розмір зернівок, вміст ліпідів, пентозанів та білка (Turnbull, Rahman, 2002). Текстура ендосперму пшениці контролюється кількома генами, які локалізовані на короткому плечі хромосоми 5D, у так званому *Ha* (*Hardness*) локусі. Фріабілін регулює ступінь адгезії між крохмальними гранулами зернівки і білковим матриксом,

що визначає структуру зерна пшениці (Pasha et al., 2010). Пуроіндоліни, як поверхнево активні білки, взаємодіючи з ліпідами мембран крохмальних зерен, оберігають їх від руйнування при помелі. Наявність пуроіндолінів між гранулами крохмалю і полярними ліпідами послаблює сильні взаємодії між ними, що призводить до різного рівня м'якості пшениці (Ali et al., 2015). Було досліджено, що твердість зерна пшениці істотно збільшується при зменшенні кількості пуроіндолінів за використання методу РНК-інтерференції для замовчування генів *Pin-D1* (Gasparis et al., 2013). Пуроіндоліни *a* та *b* містять десять залишків цистеїну і триптофан-багатий домен та формують альфа-спіральну структуру (Ramalingam et al., 2012).

Дикий тип м'яких пшениць має м'яку структуру ендосперму, що пов'язано з наявністю алелів *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*. У твердозерних пшениць один з генів чи обидва, або ж продукти цих генів, неактивні через ряд нефункціональних мутацій, викликаних переважно делеціями регіонів генів або ж однонуклеотидним поліморфізмом (Single nucleotide polymorphism, SNP). Серед мутацій трапляються зрідка також інсерції та делеції повної послідовності гена чи цілого локусу (Iftikhar, Ali, 2017).

Було визначено, що наявність мутації у гені *Pina-D1* зумовлює істотно більше підвищення твердості зерна, аніж мутації гена *Pinb-D1* (Matus-Cádiz et al., 2008). За умови наявності нуль-алелів обох генів *Pina-D1* та *Pinb-D1* зерно м'якої пшениці має твердішу текстуру, ніж у твердої пшениці (Chen et al., 2006).

Кондитерські вироби з борошна спеціальних м'якозерних зразків пшениці мають низку переваг за якістю порівняно з випічками, отриманими на основі борошна звичайної хлібопекарської пшениці. Вищу якість бісквітів зумовлюють декілька основних фізико-хімічних властивостей: більш низька водопоглинальна здатність борошна, тонкокрупчаста структура, характерна природна розпушеність та низький відсоток ушкоджених крохмальних гранул. Бісквіти відрізняються від хліба, передусім, високим вмістом цукру, що становить майже третину загальної маси тіста. Звідси і особливі вимоги

до кондитерського борошна. Воно має бути якомога менш гідрофільним, тобто поглинати небагато води, яку додають до тіста. Оскільки помел м'яких пшениць вбирає обмаль води, більша її частина йде на розчинення цукру, що поліпшує дифузію сиропу в тісті. Такий заміс здатний деякий час залишатися рідким за високих температур випікання, що забезпечує потрібне розширення його під дією розпушувачів, а отже, й значно підвищує якість кінцевого продукту (Рибалка, 2011).

Змінений склад крохмалю. Зернові культури зі зміненим складом крохмалю, маючи важливі для виробництва унікальні характеристики, є основою для створення сортів спеціального призначення, які б задовольняли зростаючі потреби виробників у різноманітній високоякісній сировині. Крохмаль становить близько 60–70 % основної запасуючої тканини зернівки (ендосперму) злаків. Гранули крохмалю складаються з двох гомополісахаридів: лінійної амілози (20–25 %) та розгалуженого амілопектину (70–75 %). Полісахариди крохмалю побудовані із залишків D-глюкози, об'єднаних в амілозі та лінійних ланцюгах амілопектину α -1–4-зв'язками, а в точках розгалуження амілопектину – міжланцюговими α -1–6-зв'язками (James et al., 2003; Hannah, 2007). Коливання співвідношення амілози і амілопектину у крохмальних гранулах значною мірою впливає на технологічні властивості зерна та його поживну цінність.

Головним ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтаза крохмалю GBSSI (granule bound starch synthase I), яка має назву Wx-протеїн. Синтез амілопектину кодується багатьма генами: ферментів-синтетаз крохмалю SSI, SSII, SSIII; ферментів розгалуження ланцюга крохмалю SBEI, SBEIIa, SBEIIb; ферментів де-розгалудження ланцюга крохмалю DBE (Игнатьева и др., 2009). Ферменти SBE – трансглікозилазні ензими, які каталізують формування α -1,6 зв'язків всередині полімеру шляхом відколу внутрішніх α -1,4 зв'язків. У однодольних знайдено три ізоформи ферменту – SBEI, SBEIIa та SBEIIb.

За використання методики РНК-інтерференції, при замовчуванні генів *SBE*, були отримані лінії пшениці з підвищеним вмістом амілози (Regina et al., 2006; Sestili et al., 2010). Одночасний сайленсинг обох генів *SBEIIa* і *SBEIIb* (але не одного) приводив до підвищення вмісту амілози в зернах злакових рослин до 70 % (Regina et al., 2006). Замовчування гена *SBEIIa* викликає помітні зміни вмісту амілози у зерні, морфології гранул та складу крохмалю. Одна із отриманих Сестілі із співавт. (Sestili et al., 2010) ліній твердої пшениці MJ16-112 містить близько 70 % амілози в складі крохмалю, що є істотним підвищенням порівняно із звичайним зерном. Конструкція, яка використовувалась при створенні даної лінії, містила сенсову та антисенсову послідовності перших трьох екзонів гена *SBEIIa* під контролем промотора та термінатора *Dx5* субодиниці високомолекулярних глютенінів. В якості маркерного використаний *bar* ген, який забезпечує стійкість до гербіцидів на основі фосфінотрицину.

За поживністю, крохмаль в харчових продуктах може бути класифікований на швидко засвоюваний крохмаль (rapidly digestible starch – RDS), повільно засвоюваний крохмаль (slowly digestible starch – SDS) і резистентний крохмаль (resistant starch – RS). RS може бути додатково розділений на три категорії залежно від причини стійкості до перетравлювання (Englyst et al., 1992; Englyst et al., 2007; Brouns, 2020).

У термічно обробленій їжі молекули амілози швидко реасоціюють при охолодженні з утворенням комплексів, які чинять опір травленню, в той час як молекули амілопектину реасоціюють повільно і саме тому він легше перетравлюється, що пояснює більший вміст RS у продукції з підвищеним вмістом амілози. Дослідження впливу пшениці із вмістом амілози понад 70 % та, відповідно, підвищеною кількістю резистентного крохмалю, проведене на щурах, підтвердили його позитивний вплив на шлунково-кишковий тракт та функціонування організму в цілому (Regina et al., 2006). Отримані результати підтвердили попередні дослідження позитивного впливу ячменю із

підвищеним вмістом стійкого крохмалю (Bird et al., 2004; Topping et al., 2003).

Отже, здатність резистентного крохмалю позитивно впливати на стан організму та попереджати такі серйозні неінфекційні захворювання як ожиріння, діабет робить надзвичайно важливим та перспективним напрямом отримання й аналіз ліній пшениці із підвищеним вмістом амілози в складі крохмалю зернівки.

Каротиноїди. Сімейство каротиноїдних пігментів налічує близько 750 сполук, які присутні у рослинах, бактеріях та грибах (DellaPenna, Pogson, 2006). Усі каротиноїди утворюються із фітоїну і більшість із них C_{40} полієни. Вони відіграють ключову роль у фотосинтезі, оскільки необхідні для правильної побудови фотосистем і світлопоглинальних комплексів, а також виконують фотопротекторну функцію, зменшуючи окиснювальне пошкодження (Demmig-Adams, Adams, 1996; Niyogi et al., 1997).

Поживна цінність каротиноїдів визначена переважно провітамінною активністю β -каротину, α -каротину, β -криптоксантину та інших пігментів із мінімум одним незмінним безкисневим іоном в одному кільці (Trope, 2019). Синтез каротиноїдів відбувається за метаболічним шляхом, в який залучено не менш як 10 різних ферментів (Hirschberg, 2001). Хоча вміст жовтого пігменту залежить від умов навколишнього середовища, він переважно визначається генотипом рослини (Miskelly, 1984).

Активність поліфенолоксидази. Одержано багато свідчень, що активність поліфенолоксидази визначається, головним чином, алелями *PPO*, що знаходяться у хромосомах 2-ї гомеологічної групи геномів пшениці A і D (Raman et al., 2007; Sun et al., 2011). Крім того, була ідентифікована родина генів, що складається з генів *Ppo-A2*, *Ppo-B2* та *Ppo-D2*, які також мають значний вплив на рівень активності PPO (Beecher, Skinner, 2011). Для визначення активності генів, що кодують поліфенолоксидазу пшениці, ефективними виявились STS (Sequence tagged site)-маркери (He et al., 2007). Виявлення алельного поліморфізму генів *Ppo-A2*, *Ppo-B2* та *Ppo-D2* можна

здійснювати за допомогою систем молекулярних маркерів, заснованих на полімеразних ланцюгових реакціях (Beecher et al., 2012).

1.5. Пшенично-житні транслокації

Озима м'яка пшениця виникла як самостійний вид внаслідок двох міжвидових схрещувань, які супроводжувались подвоєнням кількості хромосом. В подальшому більшого впливу на її розвиток надала селекція, спрямована на покращення необхідних для людини показників. Багаторічна селекція перетворила пшеницю у вид з низькою генетичною різноманітністю порівняно зі своїми дикими предками. Генотипи диких злаків часто несуть гени стійкості до біотичних й абіотичних чинників і є джерелом для розширення генетичного різноманіття м'якої пшениці.

Завдяки екологічній пластичності, сорти пшениці можуть вирощуватись на великих територіях різних кліматичних зон. Однак їх генетична одноманітність призводить до зменшення врожаю внаслідок пошкоджень новими расами патогенів. З метою підвищення стійкості та розширення генетичного різноманіття пшениці, гени, які контролюють господарсько-цінні ознаки, вводяться в генотип пшениці від дикорослих злаків методом міжвидової гібридизації (Моргун та ін., 2015) або методами генетичної трансформації (Дубровна та ін., 2014). Світова тенденція у програмах з генетичного поліпшення пшениці на теперішній час пов'язана із застосуванням інтрогресивної гібридизації, простих парних та бекросних схрещувань. В цілому, використання традиційних та новітніх генетичних, молекулярно-генетичних методів дозволяє істотно розширити генофонд пшениці, створювати нові сорти, стійкі до біотичних і абіотичних стресових чинників довкілля, з покращеними ознаками якості.

Серед сортів, ліній та іншого селекційного матеріалу м'якої пшениці, що містять гени, одержані в результаті міжвидової та міжродової гібридизації, особливе місце займають форми з пшенично-житніми

заміщеними хромосомами або пшенично-житніми транслокаціями (Lukaszewsky et al., 1982). Поширення одержали сорти м'якої пшениці, що містять пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS, меншою мірою – транслокацію 1AL.1RS, а також заміщення хромосоми 1B на 1R (Моргун та ін., 2015).

Походження транслокацій хромосом інтенсивно вивчається генетично та історично. Виявилося, що існує переважно чотири джерела походження – два в Німеччині (Schlegel, Korzun, 1997), одне в США і одне в Японії. Сорт 'Salmon' є представником 1BL.1RS (Tunewaki, 1964), а сорт 'Amigo' є представником групи 1AL.1RS (Berzonsky et al., 1991), включає коротке плече від хромосоми 1R жита аргентинського сорту 'Insave' (Козуб та ін., 2005). Разом з тим, майже в усіх сортах німецького походження можна виявити 1BL.1RS або 1AL.1RS (Zeller, 1973). З приводу походження транслокаційного плеча 1RS у каріотипах пшениці, існують дані, що у складі найбільш поширеної транслокації 1BL.1RS міститься коротке плече першої хромосоми жита від сорту 'Petcus' (Козуб та ін., 2001). Багато дослідників схиляються до думки, що існує лише одне німецьке джерело походження 1BL.1RS та 1AL.1RS транслокацій (Moonen, Zeven, 1984; Schlegel, Korzun, 1997).

Після перших згадок в літературі про спонтанну заміну в хромосомах 5R (5A) пшениці пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS було описано понад 650 сортів з усього світу (Riley, 1958). Дослідження показали, що від 45 % до 55 % світових сортів пшениці містять транслокації (Zhou, 2007). В Угорщині 53 % сортів пшениці, зареєстрованих протягом останніх двадцяти років, несуть 1RS транслокацію. Це переміщення транслокацій було визнано настільки важливим, що було включено в більш як 60 сортів пшениці, в тому числі ліній ярої пшениці, що займають майже 40 мільйонів гектарів (Hoffmann, 2008).

У 2011 році близько 1050 сортів мали транслокацію 1BL.1RS, близько 100 сортів транслокацію 1AL.1RS і близько 30 сортів 1R (1B) заміщення

(Schlegel, 2015). За результатами досліджень, проведених у 1998 році в Інституті рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, у м'якої пшениці виявлено 68 чужорідних транслокацій, що несуть гени стійкості проти хвороб і шкідників та інші цінні адаптивні ознаки. Найбільш поширеними були 1BL.1RS – 312 зразків, 1AL.1RS – 13, 2BS.2RL і 6BS.6RL по одному зразку (Rabinovich, 1998).

Більшість вітчизняних сортів, що несуть пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS, одержали її від відомих сортів озимої м'якої пшениці 'Кавказ' і 'Аврора' (Rabinovich, 1998), які були створені у результаті включення до гібридизації однієї з форм пшениці, одержаної від схрещування пшениці з житом. За даними (Трубачева и др., 2011; Моргун та ін., 2015) саме сорт 'Кавказ', створений у 1972 р. академіком П.П. Лук'яненком з використанням як одного із компонентів схрещування пшенично-житньої заміщеної 1R (1B) лінії Neuzucht 14/14, був включений у багатьох країнах світу до родоводів сортів пшениці. Так, аналіз 46 вітчизняних сортів пшениці м'якої озимої першого–четвертого покоління виявив пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS у 22 сортів, а транслокацію 1AL.1RS – у 4 сортів (Власенко, 2008). Відомо, що ціла хромосома жита 1R, або її коротке плече, додані до геному м'якої пшениці, не впливають на фертильність рослин (Friebe, 1996). Це може бути пов'язано з тим, що хромосома жита 1R в процесі еволюції геномів не брала участі у міжхромосомних перебудовах і зберегла повну гомеологію по відношенню до хромосом пшениці, що дозволяє їй повністю компенсувати відсутність хромосоми пшениці або її частини у заміщених або транслокованих форм. Існують також дані про підвищену стерильність пилку у сортів із заміщенням 1B хромосоми пшениці на 1R хромосому жита, або з житньою транслокацією порівняно з формами без хромосомних перебудов, відмічається також достовірно більша частота хромосомних аберацій у клітинах кореневої меристеми проростків (Колучая, Колучий, 1988).

Присутність у довгому плечі 1В хромосоми пшениці транслокації 1RS.1BL сприяє підвищенню врожайності та стійкості пшениці до чинників зовнішнього середовища (Козуб та ін., 2005). Такі сорти містять гени стійкості проти бурої іржі (*Lr26*), борошнистої роси (*Pm8*), стеблової іржі (*Sr31*), жовтої іржі (*Yr9*), вірусу смугастої мозаїки (*Wsm*), попелиці (*Gb*). Сорти пшениці, які несуть в геномі транслокацію від 1R хромосоми жита, мають коротке стебло і характеризуються кращою продуктивністю за сприятливих погодно-кліматичних умов (Власенко та ін., 2000).

Транслокація 1BL.1RS досить широко поширена в світі, а ось 1AL.1RS зустрічається рідко. Так, за результатами аналізу 44 іранських сортів пшениць було виявлено наявність транслокації 1BL.1RS лише у 5 сортів – ‘Dez’, ‘Atrak’, ‘Rasul’, ‘Falat’ і ‘Moghan 3’, тоді як транслокація 1AL.1RS взагалі була відсутня (Tabibzaden et al., 2013).

У 2003 році американськими дослідниками було відмічено залежність урожаю пшениці сорту ‘Pavon’ від розміру кореневої системи. На основі молекулярних аналізів встановлено, що розмір кореневої системи змінювався залежно від наявності житніх транслокацій у такому порядку: 1BL.1RS < 1DL.1RS < 1AL.1RS (Ehdaie et al., 2003). Це може слугувати як додаткова генетична ознака і використовуватись в селекції на стійкість до посухи (Sharma et al., 2010, 2011). Адже, чим більше розвинена коренева система рослини, тим краще поглинається волога та поживні речовини.

Як відомо, пшениця, яка містить в геномі транслокацію 1AL.1RS, більш продуктивна ніж та, в якій немає транслокацій. Були досліджені адаптивні властивості гібридних ліній F₅ до низьких температур та посухи порівняно із сортами без транслокацій. У гібридних комбінаціях сорту ‘Княгиня Ольга’ з сортами ‘Куяльник’ і ‘Антонівка’, транслокація 1AL.1RS в стресових умовах 2012 року на півдні України мала підсилюючий ефект на стійкість до низьких температур та формування врожайності. Вплив транслокації залежить від генотипного середовища, умов вирощування та

підбору батьківських форм, які контролюють певні ознаки та властивості (Топаля та ін., 2013).

Господарська цінність сортів м'якої пшениці, що мають транслокації 1BL.1RS та 1AL.1RS, зумовлена позитивним ефектом на стійкість рослин до ряду хвороб, абіотичних стресів, урожайність, що пов'язано із впливом короткого плеча хромосоми жита 1R. Розташування генів стійкості у короткому плечі хромосоми жита 1RS таке: центромера–*Sec1–Lr26/Sr31/Yr9*–теломера (Singh et al., 1990). Транслокація 1AL.1RS набула розповсюдження серед комерційних сортів завдяки наявності генів стійкості до біотипів попелиці (*Gb2*, *Gb6*), борошнистої роси (*Pm17*), кліща (Козуб та ін., 2005).

Рослини пшениці із житньою транслокацією можуть бути більш посухостійкими, з підвищеною адаптаційною здатністю, у них збільшується врожайність, вміст білка в зерні (Kim et al., 2004; Hoffmann, 2008). У трьох сортів ярої м'якої пшениці, створених у Західному Сибіру за участю сорту 'Кавказ', що несе пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS, вміст білка і сирої клейковини в зерні знаходились або на рівні сортів, що не мали транслокації, або перевищували їх (Трубачева и др., 2011). Сорти 'Омська 37' і 'Омська 38' виявляли польову стійкість до бурої іржі та борошнистої роси. Сорт 'Омська 29' був сприйнятливий до патогенів. Обговорюється значення прямого добору при створенні сортів пшениці, що несуть пшенично-житню транслокацію.

Слід зазначити, що прояв генів, локалізованих у короткому плечі 1RS жита, залежить від генотипу (генотипного середовища) сортів пшениці (Zhou, 2007). У деяких сортів м'якої пшениці, які мають транслокацію 1BL.1RS, експресія гена *Pm8* може бути пригнічена через вплив домінантного гена-супресора, що локалізований у хромосомі 7D пшениці (Hanusova et al., 1996). Слід враховувати генетичний фон при порівнянні показників якості зерна у сортів з пшенично-житньою транслокацією.

Негативний вплив житньої транслокації на якість зерна пшениці.

Ділянка житньої хромосоми є джерелом не лише цінних ознак, але й додає її

носіям негативних властивостей, що може бути лімітуючим фактором її використання. Головний акцент при цьому роблять на зниженні хлібопекарських якостей зерна пшениці. Вважається, що наявність транслокації 1AL.1RS, на відміну від 1BL.1RS, не призводить до істотного зниження хлібопекарської якості зерна пшениці (Власенко, Кадхим, 2012). Ймовірно, що синтез запасних білків жита (секалінів) може бути однією із головних причин негативного впливу пшенично-житньої транслокації на якість зерна. Важливим моментом можуть бути зміни у фракційному складі білків зерна пшениці (Lee et al., 1995). Зокрема, в зерні жита накопичуються антиметаболіти, серед яких інгібітори трипсину, котрі можуть негативно впливати на метаболізм у різних організмів.

Однак, дослідження створених ліній ярої м'якої пшениці сорту 'Омська 37', у яких методом геномної *in situ* гібридизації виявлено пшенично-житню транслокацію 1BL.1R, засвідчило, що її наявність у каріотипі досліджених ліній не впливала на збільшення вмісту активного інгібітора трипсину у зерні (Белан и др., 2010). Із 20 досліджених ліній виділено 5 з комплексною стійкістю до листових патогенів, високою врожайністю і якістю зерна. Зроблено висновок, що коротке плече хромосоми жита 1RS сорту 'Петкус', що входить до складу пшенично-житньої транслокації, не знижує поживної цінності зерна пшениці. Крім того, в роботі не виявлено кореляції між вмістом білка та вмістом інгібіторів трипсину в зерні, що суперечить даним тих авторів, які виявили позитивний кореляційний зв'язок між рівнем вмісту інгібітора та білковістю (Литвиненко и др., 1999), але узгоджується з результатами інших дослідників (Tanner, Reinbergs, 1972).

Виявлено, що транслокація 1AL.1RS не призводить до такого різкого зниження показників якості зерна пшениці як 1BL.1RS. Показано кращі показники (зокрема SDS- седиментації) у форм з 1AL.1RS, що може свідчити про її переваги при використанні у селекції (Graybosch et al., 1993).

Ідентифікація та особливості передачі пшенично-житньої транслокації. Для ідентифікації житньої 1R хромосоми, або її короткого плеча у складі транслокацій 1AL.1RS, 1BL.1RS, 1DL.1RS у сортів і ліній пшениці використовують біохімічні, молекулярно-біологічні, цитогенетичні, молекулярно-цитогенетичні методи (Козуб и др., 2001). Достатньо традиційним є електрофорез за біохімічними маркерами – секалінами, спирторозчинними запасними білками жита, що кодуються локусом *Sec-1*, розміщеним у короткому плечі хромосоми 1R, та іншими білковими маркерами.

Ефективність пшенично-житніх транслокацій з 2RL, так як і з 1RS, залежить від генотипного середовища сорту, у який вона переноситься. Тому у практичній селекції дуже важливим є дослідження особливостей передачі хромосом жита у геном пшениці. Використовуючи генетичні методи бекросування та цитологічні С-методи диференціального забарвлення хромосом у комплексі з геномною *in situ* гібридизацією для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій, досліджується характер передачі хромосом жита при бекросуванні пшенично-житніх заміщених ліній сортами м'якої пшениці (Рибалка, 2011). У нащадків бекросних гібридів хромосоми жита виявляються як у дисомному, так і моносомному стані, зустрічаються телоцентрики. Показано, що на частоту і характер передачі житньої хромосоми впливає генотип як лінії з пшенично-житньою транслокацією або заміщенням, так і сорту, що використовується у схрещуванні.

Значне число різних сортів та ліній з пшенично-житніми транслокаціями були створені в Швеції професором Анрульфом Меркером з гексаплоїдного тритикале (яке, як виявилось, цінне саме по собі) (Рибалка та ін., 2015) та пшениці. Були використані сорти та лінії ярої пшениці – ‘Drabant’, ‘Prins’, ‘Sonett’, ‘SV 77328’ і яре тритикале сортів ‘Beagle’ і ‘Drira’. Отримані F_1 цих комбінацій піддавали зворотному схрещуванню з пшеницею і BC_1F_1 . У результаті різних комбінацій були отримані лінії з пшенично-житніми транслокаціями (Merker, 1992). Крім того, дві пшенично-житні 1R і

2R транслокації з гексаплоїдного озимого тритикале ‘Sv856003’, ‘Sv876012’, ‘Sv876032’, стренгової пшениці (*Leymus mollis*) лінії ‘AD99’, і шведські сорти озимої пшениці ‘Goerzen’, ‘Holme’ і ‘Kraka’ були використані для прямого та зворотного схрещування (Forsstrom et al., 2002).

За допомогою ряду прямих та зворотних схрещувань ярої гексаплоїдної пшениці з дикорослими злаками отримано лінії з транслокацією 5RL.5BS, які були стійкі до ураження жовтою і стебловою іржею та несли відповідні гени стійкості (Singh et al., 2011).

Для ідентифікації транслокації 1BL.1RS часто використовують геномну *in situ* гібридизацію (GISH). Цей метод дозволяє виявити коротке плече 1R хромосоми у складі транслокації і таким чином відповісти на питання про наявність або відсутність ділянки житньої хромосоми у досліджуваних рослин. Використання геномної *in situ* гібридизації дозволило показати (Sharma et al., 2010), що не всі сорти пшениці, які мають у своєму родоводі сорт ‘Кавказ’, містять пшенично-житню транслокацію. Геномну *in situ* гібридизацію виконували за методикою (Mukai, Gill, 1991). В якості зонда для геномної гібридизації використовували мічену біотином тотальну ДНК, виділену із рослин жита посівного. Із 9 досліджених сортів пшенично-житня транслокація була виявлена у лише трьох (‘Омська 29’, ‘Омська 37’ і ‘Омська 38’). При цьому сорти ‘Омська 37’ та ‘Омська 38’, що мали транслокацію, є сестринськими лініями, а сорт ‘Кавказ’ використовувався у якості материнської форми. При створенні інших сортів, які досліджувались у даній роботі, сорт ‘Кавказ’ був батьківською формою. Одержані дані, на думку авторів, свідчать про особливості передачі чужорідного генетичного матеріалу при інтрогресивних схрещуваннях, адже не у всіх випадках нащадки містять пшенично-житню транслокацію.

Аналогічні результати одержано й іншими авторами (Szakacs et al., 2004). Так, при створенні шести нових сортів озимої м’якої пшениці за участю сорта ‘Magdalena’, що мав транслокацію 1BL.1RS, пшенично-житня транслокація була виявлена лише у одного нового сорту. У інших п’яти

сортів сегментів хромосоми жита не було. Такий феномен може бути пов'язаний з тим, що здатність до запліднення у чоловічих гамет, що несуть пшенично-житню транслокацію, знижується. Втрату транслокованої хромосоми можна пояснити і тим, що у гетерозиготних генотипів частота утворення гамет з транслокацією досить низька (Козуб и др., 2001).

Цитогенетичний метод аналізу хромосом у мейозі і мітозі достатньо широко використовується для виявлення інтрогресій у геном пшениці. Аналіз мейозу дозволяє одержувати важливу інформацію про генетичну близькість досліджуваних форм. Головний для мейозу процес – це кон'югація гомологічних хромосом у профазі 1, а потім їх розходження для утворення в подальшому редукованих гамет. Гомологія хромосом визначається генетичною спорідненістю їх окремих ділянок і локалізованих у них генів. Якщо відбуваються істотні зміни у структурі хромосом і генів, гомологія порушується, кон'югації хромосом і утворення пар бівалентів не відбувається. Аналіз конфігурацій, які утворюють хромосоми у профазі 1 мейозу (поліваленти, біваленти, уніваленти), є важливим критерієм для дослідження змін у каріотипах досліджуваних форм. Так, використання цитологічного аналізу та дослідження хромосом у метафазі 1 мейозу гібридів F_1 дозволило виявити наявність хромосомних заміщень і транслокацій у каріотипах інтрогресивних ліній озимої пшениці (Моцный и др., 2012).

Слід зазначити, що цитологічна ідентифікація хромосом жита або їх ділянок у каріотипі пшениці є не такою вже й складною, адже використовуючи диференціальне забарвлення хромосом, а саме C-banding, можна ідентифікувати хромосоми жита за темнозабарвленими теломерними гетерохроматиновими ділянками. Цей метод дозволив провести ідентифікацію генотипів з пшенично-житньою транслокацією 1BL.1RS у гетерозигот F_1 (Singh et al., 1990). Можливості генетичного картування та виявлення рекомбінацій, пов'язаних з локусом *Gli-B1* та теломерним C-гетерохроматином, за допомогою методу C-banding у пшениці були представлені у роботі (Gonzalez et al., 1990).

Використання молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації окремих генних локусів є сучасним, дієвим методом аналізу геномів рослин. Знаючи інформацію про походження сортів або ліній, дослідивши картини мейозу, стійкість до фітопатогенів, підбирають молекулярні маркери до відомих цільових генів. Наприклад, для аналізу генотипів з пшенично-житньою транслокацією обирають мікросателітні маркери жита або пшениці (Landjeva et al., 2006; Сиволап и др., 2011; Мощный и др., 2012).

Виявлення наявності найпоширеніших у геномі пшениці (Lukaszewsky et al., 1982) житніх інтрогресивних транслокацій можливе кількома підходами. Для детекції нових раніше невідомих транслокацій використовують молекулярно-біологічні, молекулярно-генетичні, цитогенетичні методи; біохімічні або фізіологічні підходи (Gupta, 1992; Verzonsky, 1999; Сиволап, 2011; Козуб, 2012).

Особливе значення в селекційній практиці надається застосуванню молекулярно-генетичних досліджень, які дають можливість охарактеризувати внутрішньо- та міжвидове генетичне різноманіття рослин, порівнювати геноми та встановлювати ступінь їх спорідненості, виявляти відмінності між сортами на рівні генотипу. За наявності батьківських форм для виявлення транслокацій підходять ПЛР методи з ДНК-маркерами. Надалі транслокативна природа виявленого поліморфізму і генетичних змін має бути підтверджена. До перенесених генів, повторів нуклеотидних послідовностей підбирають видоспецифічні праймери, якими легко відслідковують інтрогресивні фрагменти ДНК в подальшому.

Зручною міткою транслокацій 1AL.1RS, 1BL.1RS є локус запасних білків *Sec-1*, розміщений на короткому плечі першої хромосоми жита (1RS) у зоні хромосомного сателіту приблизно 30 сМ рекомбінації від ядерцевого організатора. Проте для модифікованої транслокації 1RSm.1BL він відсутній.

Існує багато різних ДНК-маркерів для виявлення пшенично-житньої транслокації методом ПЛР із подальшим залученням електрофорезу фрагментів ДНК у агарозних гелях. Найкращі результати показали праймери,

запропоновані рядом науковців (Rogowsky, 1992; Saal, 1999; Khlestkina, 2004; Chai, 2006; Сиволап, 2011), які давали довжину ампліконів в межах 200–400 п.н., що були зручними для чіткого розділення у гелі. Ці маркери дозволяли виявляти як наявність житніх транслокацій в цілому (по локусу *Xrems1303* жита або характерних генів секалінів *Sec-1*), так і розрізняти тип транслокації по локусу *SCM9*, або були націлені суто на транслокацію 1AL.1RS. Особливого значення набувають методи, що дозволяють ідентифікувати в одній реакції декілька ділянок ДНК, що обмежені різними парами праймерів.

Для ідентифікації короткого плеча першої хромосоми жита (1RS) у складі пшеничного геному достатньо традиційним, хоча не завжди зручним і надійним, є електрофорез за біохімічними маркерами – секалінами, спирторозчинними запасними білками жита, що кодуються локусом *Sec-1*. Висловлюється думка, що прояв генів, локалізованих у короткому плечі 1RS жита, залежить від генотипу (генотипного середовища) сортів пшениці (Козуб и др., 2001; Zhou et al., 2007). Білковий аналіз потребує наявності зернового матеріалу досліджуваного сорту, що робить неможливим аналіз зеленої маси гібридів. Разом з тим це є цінний підхід, бо дозволяє валідувати методики біотехнологічних досліджень, а також проводити додаткове підтвердження відібраних ліній на етапі отримання насіннєвого матеріалу.

Модифікована пшенично-житня транслокація. Професором А. Лукашевським шляхом хромосомної інженерії було створено оригінальні транслокантні форми (1RSm.1BL), у яких замість 1RS плеча жита міститься модифікована 1RSm конструкція. Від оригінального плеча жита вона відрізняється двома інтеркалярними вставками, які являють собою фрагменти плеча пшеничної хромосоми і характеризуються відсутністю локусу *Sec-1*. Використання ліній з модифікованою пшенично-житньою транслокацією вважається перспективним у селекції пшениці, оскільки у цих форм відсутній локус *Sec-1*, який негативно впливає на якість борошна (Lukaszewski, 1990). Для ідентифікації житньої 1R хромосоми або її

короткого плеча 1RS у складі пшенично-житніх транслокацій у сортів і ліній пшениці використовують сучасні біохімічні, молекулярно-генетичні методи дослідження.

Джерелом господарсько-корисних ознак для пшениці може бути також хромосома жита 2R. Хромосома 2R не виявляє негативного впливу на якість зерна. Наявність у геномі пшениці довгого плеча хромосоми жита 2R збільшує вміст арабіноксилану у зерні, який позитивно впливає на поживну якість хліба. На хромосомі 2R локалізовані гени стійкості до борошнистої роси, листкової і стеблової іржі та гессенської мухи (Красилова и др., 2011). Таким чином, наявність генів стійкості, відсутність негативного впливу на продуктивність роблять хромосому жита 2R добрим джерелом для покращення пшениці.

В сортах озимої пшениці української селекції виявлено транслокації двох типів 1AL.1RS і 1BL.1RS. На даний час, дослідження властивостей сортів за наявності пшенично-житніх транслокацій досить актуальне, адже механізм взаємодії різних генів із заміщеними частинами хромосом та прояв господарських ознак недостатньо вивчений.

Таким чином, аналіз даних світової та вітчизняної літератури свідчить про актуальність і перспективність досліджень пшенично-житніх транслокацій для генетичного поліпшення пшениці, в тому числі для забезпечення високого рівня врожайності у поєднанні зі стійкістю до широкого спектра біотичних і абіотичних чинників.

Підсумовуючи, слід зазначити, що генетичне поліпшення рослин зумовлюється зростаючими вимогами сільськогосподарського виробництва до сортів та гібридів. Як свідчать дані літератури, знання щодо методів та способів удосконалення рослин постійно розширюються і поглиблюються. Актуальність біотехнологічних досліджень у вирішенні багатьох генетико-селекційних задач зростає і набуває якісно нового характеру. Роботи, пов'язані з відпрацюванням загальних методик введення різних тканин в культуру, оптимізації техніки культивування, які домінували на перших

етапах досліджень, поступилися місцем розробкам, пов'язаним із принципово новими клітинними і молекулярними біотехнологіями для створення форм, які мають цінні практичні властивості. Безсумнівно, для подальшого прогресу у створенні сортів нового покоління необхідно розвивати нові методи генетичної інженерії, молекулярної селекції, поглиблювати фундаментальні дослідження в області біології рослин.

Розробка новітніх методів створення високопродуктивних сортів культурних злаків, стійких до стресових чинників довкілля, вимагає комплексного підходу та мобілізації новітніх досягнень в галузі сучасної біології. Створення таких технологій буде сприяти проведенню цілеспрямованого добору вихідного матеріалу та розширить можливості щодо прискорення селекції сортів злакових культур з певними технологічними ознаками, зокрема й з поліпшеною якістю зерна, що і зумовлює актуальність, новизну та необхідність виконання даних досліджень.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріал досліджень

В якості матеріалу для проведення досліджень було використано:

1) 160 сортів пшениці м'якої озимої вітчизняного та зарубіжного походження (табл. 2.1), які були отримані в рамках договорів про співробітництво з Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України (м. Київ), Селекційно-генетичний інститутом – Національним центром насіннєзнавства та сортовивчення НААН України (м. Одеса) та Інститутом рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України (м. Харків).

Таблиця 2.1

Список досліджених сортів пшениці

Оригіна́тор, походження	Сорти
Вітчизняна селекція	
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, м. Київ	Борія, Володарка, Гілея, Грездівлиця, Доброслава, Здобуток, Золото України, Київська остиста, Лідер, Нива Київщини, Новокиївська, Новосму́глянка, Подолянка, Полянка, Соломія, Солоха, Сотниця, Фаворитка, Чорнява, Ятрань 60
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України і Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України	Богдана, Веснянка, Зимоярка, Золотоко́лоса, Колумбія, Крижинка, Ласуня, Наталка, Переяславка, Пивна, Славна, Сму́глянка, Сонечко, Спасівка
Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України, м. Миронівка	Миронівська 30, Миронівська 61, Миронівська 65, Миронівська 808
ННЦ Інститут землеробства НААН України, м. Київ	Недра, Поліська 90
Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН України, м. Харків	Доскона́ла, Статна
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, м. Одеса	Альбатрос одеський, Антонівка, Білява, Борвій, Бунчук, Ватажок, Вихованка, Гармонія, Годувальниця, Господиня, Гурт, Дальницька, Доброчин, Доброчинна, Древлянка, Дворянка, Дюк, Єдність, Жайвір, Журавка, Заграва, Задумка, Заможність, Запорука, Звитяга, Зиск, Зміна, Знахідка, Зорепад, Істина, Кірія, Княгиня Ольга, Косовиця, Красень, Куяльник, Лад, Лановий, Ластівка одеська, Лебідка одеська, Литанівка, Ліона, Місія, Небокрай, Нива Одеська, Ніконія, Одеська 51,

Оригігатор, походження	Сорти
	Одеська 265, Одеська 267, Отаман, Панна, Пилицівка, Писанка, Повага, Подяка, Польовик, Пошана, Селянка, Служниця, Соната, Супутниця, Турунчук, Ужинок, Українка, Хист, Чорноброва
Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення та ЗАТ «Селена», м. Одеса	Благодарка, Епоха, Ліра, Скарбниця
Інститут зрошуваного землеробства, м.Херсон	Херсонська безоста
ЗАТ «Селена», м. Одеса	Землячка
Білоцерківська дослідно-селекційна станція ім. О.К. Коломієць Інституту цукрових буряків НААН України, м. Біла Церква	Білоцерківська напівкарликова
Донецький інститут агропромислового виробництва НААН України, м. Донецьк	Донецька 46, Донецька 48
Фермерське господарство «Теософ»	Хуторянка
Інститут фізіології рослин і генетики НАН України та Фермерське господарство «Теософ»	Трипільська
Селянсько фермерське господарство «Родень 10»	Торчинська
Носівська селекційно дослідна станція Чернігівського інституту аграрно-промислового виробництва НААН України	Вікторія
Зарубіжна селекція	
Дойче Заатфедерелунг АГ (Німеччина)	Актер
Осева Ексімло Прага і Приватне мале підприємство «Тирас» (Чехія)	Аранка
Російська Федерація	Безоста 1
Заатбау Лінц рег.Ген.м.б.Х (Австрія)	Гренні
Зерноградська селекційна станція (Російська Федерація)	Донська напівкарликова
Державна наукова установа Краснодарський науково-дослідний інститут сільського господарства ім. П.П. Лук'яненка (Російська Федерація)	Колега
Російська Федерація	Новосибірська 67
Дойче Заатфедерелунг АГ (Німеччина)	Трізо
Заатен-Уніон ГмбХ (Німеччина)	Тюбальт

Оригіатор, походження	Сорти
Угорщина	Bankuti
Китай	Chinese spring
Мексика	Bobwhite
Чехія	Federer
Університет Манітоби (Канада)	Glenlea, Corell
Канада	Marquis, Oslo
Ізраїль	Nirit
Японія	Norin 16, Norin 29, Norin 35

2) сорти ячменю: ‘Барка’, ‘Беатрикс’, ‘Геліус’, ‘Гладіс’, ‘Джарзей’, ‘Ебсон’, ‘Скарлет’;

3) дослідження генетичного різноманіття спельти за допомогою IRAP-маркерів проводили на 10 різних зразках: *T. spelta* 5 УК 5C/15, *T. spelta* ‘Зоря України’, *T. spelta* 2 УК 2C/15, *T. spelta* 3 УК 3C/15, *T. spelta* 4 УК 4C/15, *T. spelta* 8/14 УК 8C/14, *T. spelta* 7/14 УК 7C/14, *T. spelta* ‘Oberkulmer Rothkorn’ УК 19C/15, *T. spelta* ‘Frankenkorn’ УК 9C/15, *T. spelta* ‘Baulaender’ УК 11C/15;

4) вивчали 15 мутантних ліній тритикале зі зміненим складом крохмалю в зерні;

5) для впровадження маркерних систем для виявлення пшенично-житніх транслокацій та алелів високомолекулярних глютенінів були використані вибірки (від 100 до 200 зразків) селекційних гібридів з Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту НААН України;

6) для впровадження маркерних систем для алелів генів поліфенолоксидазної активності були використані 38 ліній білозерної озимої м’якої пшениці та 64 синтетичні лінії пшениці, одержані у Селекційно-генетичному інституті;

7) вибірка харчових продуктів, включала в себе: 24 зразки пшеничного борошна вітчизняного та російського виробництва, 14 зразків вітчизняної та зарубіжної локшини, 7 продуктів із замороженого тіста.

Матеріалом дослідження також були представники антарктичної флори: щучник антарктичний *Deschampsia antarctica* родини Злакові (*Poaceae*) і низка представників класу мохів: *Physcomitrella patens*, *Warnstorfia fontinaliopsis*, *Bryum pseudotriquetrum*, *Bryum argenteum*, *Pohlia nutans*, *Polytrichum juniperinum*. Зразки рослин були отримані у 15-тій антарктичній експедиції на українській дослідній станції «Академік Вернадський», яка розташована на мисі Марина острова Галіндез за 7 км від західного узбережжя Антарктичного півострова.

Матеріалом досліджень з генетичної трансформації пшениці були сорти м'якої пшениці вітчизняної селекції 'Зимоярка' та 'Подольська', надані ІФРГ НАН України. Матеріалом досліджень з генетичної трансформації кукурудзи були 8 інбредних ліній, 10 гібридів F_1 та соматоклональні варіанти на основі гібридів F_1 .

2.2. Біотехнологічні методи

2.2.1. Одержання первинної калюсної культури пшениці та умови культивування

В якості первинних експлантів для калюсогенезу використовували апікальні меристеми пшениці сортів 'Зимоярка' та 'Подольська'. Для одержання асептичних проростків-донорів апікальних меристем насіння послідовно стерилізували 1 % розчином $KMnO_4$ протягом 3 хв, 1 % розчином $AgNO_3$ – 2 хв, 96 % етиловим спиртом – 1 хв і тричі промивали стерильною дистильованою водою (Бавол та ін., 2007, 2011). Після стерилізації насіння пророщували протягом 3 діб у скляних посудинах об'ємом 200 мл за температури 24 °C і 16-годинного фотоперіоду на безгормональному середовищі МС (Murashige, Skoog, 1962). Апікальні меристеми виділяли з 3-добових проростків і розміщували на модифікованому середовищі МСК (табл. 2.2), яке містило 2 мг/л 2,4-Д і 10 мг/л $AgNO_3$, вітаміни за Гамборгом (Gamborg, Eveleigh, 1968) та 20 г/л сахарози. Експланти поміщали у чашки

Петрі (близько 50 шт) так, щоб досягалася максимальна площа контакту із середовищем, і культивували їх за 26 °С у темряві впродовж 18 діб до отримання калюсу.

Таблиця 2.2

Живильні середовища, використані у дослідженні

Середовище	Солі	Вітаміни	Додаткові компоненти	Цукри	Регулятори росту
Пророщування					
МС	MacroМС, MicroМС	за Морелем	-	20 мг/л сахарози	-
Калюсогенез					
МСК	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO ₃	20 мг/л сахарози	2 мг/л 2,4-Д
Регенерація					
МСм	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO ₃	20 мг/л сахарози	БАП (0,5; 0,75; 1 мг/л)
МСТ	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	10 мг/л AgNO ₃	20 мг/л сахарози	-
Вкорінення					
MCR1	MacroМС, MicroМС	за Морелем	-	20 мг/л сахарози	0,1 мг/л НОК
MCR2	MacroМС, MicroМС	за Гамборгом	0,15 г/л аспарагін моногідрату	10 г/л глюкози, 20 г/л мальтози	-

Незрілі зародки виділяли з насіння на 13–14 добу після запилення (Тао et al., 2011). Попередньо колоси промивали у миючому засобі, дистильованій воді та просушували. Отримане насіння піддавали стерилізації: AgNO₃ – 1 хв, 96 % етиловий спирт – 1 хв та триразово промивали стерильною дистильованою водою. Ізольовані незрілі зародки розміром 1,0–1,2 мм поміщали щитками вгору у чашки Петрі (приблизно 50 шт) на модифіковане живильне середовище МСК (табл. 2.2). Культивування проводили в темряві протягом 4–6 діб за температури 26 °С до отримання первинного калюсу.

2.2.2. Визначення впливу синтетичних регуляторів росту на частоту регенерації з калюсу пшениці м'якої

Сформований 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем, переносили на живильне середовище МС для регенерації, доповнене вітамінами за Гамборгом і регуляторами росту (табл. 2.2). Культивування проводили за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду.

Проводили визначення особливостей регенерації пагонів із 325 зразків калюсу на середовищах, доповнених дикамбою (Duchefa Biochemie, 3,6-dichloro-2-methoxy-benzoic acid), 327 – доповнених піклорамом (Duchefa Biochemie, 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid) та 1800 – доповнених БАП («Sigma»). Експланти культивували в чашках Петрі (по 50 шт). Кількість зразків морфогенного калюсу визначали на 15-ту добу культивування на модифікованих середовищах МС, доповнених різними регуляторами росту. Підрахунок утворених регенерантів проводили з 20-ї до 35-ї доби з інтервалом у 5 діб. Частоту пагоноутворення визначали як відношення числа експлантів, з яких утворилися регенеранти, до загального числа експлантів.

Регенеранти відокремлювали від калюсу і для ініціації ризогенезу висаджували на живильне середовище MCR1 (табл. 2.2). Укорінення тривало протягом 2 тижнів за температури 24 °С та 16-годинного фотоперіоду.

Адаптацію регенерантів з добре розвиненою кореневою системою до септичних умов проводили за наступною схемою: 1) сфагновий мох – первинний адаптаційний субстрат, 2) ґрунтосуміш – торф, дернова земля та пісок (2:1:1). Рослини піддавали поступовому загартуванню, збільшуючи експозицію на відкритому повітрі від 20 хв до цілодобового перебування у відкритому стані протягом 2 тижнів. Пристосовані до нестерильних умов регенеранти культивували в умовах теплиці за природного освітлення і температури 22–28 °С.

2.2.3. Генетичні вектори та агробактеріальні штами, використані в дослідженнях

У роботі використовували нопалінові штами *Agrobacterium tumefaciens* C58 та GV3101. Штам C58 містив вектор p014 (рис. 2.1), до складу Т-ДНК якого входили селективний ген *nptII* та маркерний – *sgfp*.

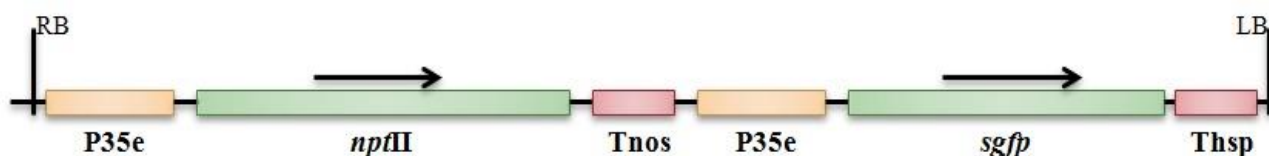


Рис. 2.1. Схематичне зображення Т-ДНК генетичної конструкції p014. Показано кодуючі послідовності генів неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) та синтетичного зеленого флуоресцентного білка (*sgfp*), підсилені промотором вірусу мозаїки цвітної капусти (P35e), термінатори нопалінсинтази (Tnos) і білка теплового шоку (Thsp). Для генів *nptII* та *sgfp* показані місця посадки пар праймерів PSGA-PSGB та gfp2F-gfp2R відповідно.

Вектор pCB203 у штамі GV3101 *A. tumefaciens* містить репортерний ген β -глюкуронідази (*uidA*), а також селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що надає стійкості клітинам рослин до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Продуктом активності гена *bar* є фосфінотрицинацетилтрансфераза (фермент, що нейтралізує фосфінотрицин), здатна забезпечити ріст та вкорінення трансгенних рослин на селективному середовищі. Для досягнення високого рівня експресії цих генів у векторі був використаний промотор поліубіквітину-1 (Ubi1) з першим інтроном кукурудзи (Christensen, Quail, 1996) (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Схематичне зображення Т-ДНК вектора pCB203. Між плечами LB і RB показано кодуючі послідовності генів *bar* та *uidA*, які направляються промоторами *pos* та Ubi1 з інтроном *intr*, термінаторами нопалінсинтази *nost* та *nos3'*.

2.2.4. Визначення інгібуючого впливу антибіотиків на клітини

Agrobacterium tumefaciens

З метою визначення інгібуючого ефекту антибіотиків тиментину (Tm) та цефотаксиму (Cf) на *Agrobacterium tumefaciens* штамів C58 і GV3101 використано метод серійного розведення (EUCAST definitive document 1998; Holasova et al., 2007) та метод дисків, описаний в роботі Прія (Priya et al., 2012). Метод серійного розведення полягає у внесенні однакової кількості досліджуваних мікроорганізмів на живильні середовища з різною концентрацією антибіотика. Для цього із добової культури бактерій готували суспензію у фізіологічному розчині з густиною 0,5 за стандартом Макфарланда ($1,5 \times 10^8$ КУО/мл). Отриману суспензію (0,1 мл) газоном висівали на поверхню середовища КА (картопляний агар), доповненого антибіотиками у концентраціях від 200 мг/мл до 500 мг/мл. Культивування проводили у термостаті за температури 30 °C протягом 24 год. Після цього проводили підрахунок КУО.

Для методу дисків щільний газон нічної культури агробактерій висівали на агаризоване живильне середовище Himedia M001 (Priya et al., 2012). Для отримання суспензії *A. tumefaciens* використовували рідке живильне середовище M002 з відповідними антибіотиками: штам C58 – канаміцин (Km) і спектиноміцин (Spc) 100 мг/л; штам GV3101 – гентаміцин (Gm) 25 мг/л, рифампіцин (Rf) 50 мг/л і карбеніцилін (Cb) 100 мг/л.

Попередньо стерилізовані диски фільтрувального паперу діаметром 6 мм змочували розчинами досліджуваних антибіотиків, висушували і поміщали на поверхню середовища. Досліджували вплив антибіотиків тиментину (Tm) та цефотаксиму (Cef) на *A. tumefaciens* у наступних концентраціях: 100 мг/л, 150 мг/л, 200 мг/л, 250 мг/л, 300 мг/л, 350 мг/л, 400 мг/л, 450 мг/л, 500 мг/л.

Культивування проводили у термостаті за температури 27 °С протягом 48 год. По закінченні зазначеного періоду проводили лінійні виміри діаметра зон інгібування навколо дисків.

2.2.5. Визначення впливу антибіотика тиментину на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів

Для визначення впливу антибіотика тиментину на утворення морфогенного калюсу і регенерацію використовували сформований 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем пшениці сортів ‘Зимоярка’ та ‘Подольнка’. Калюс поміщали у чашки Петрі (близько 50 шт) на регенераційне живильне середовище (Gorbatyuk et al., 2015), доповнене Тm у концентраціях від 25 мг/л до 500 мг/л. Культивували за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду протягом 30-ти діб. Пасажування здійснювали кожні 14 діб. Кількість зразків морфогенного калюсу відмічали на 14-ту добу культивування. Динаміку регенерації рослин пшениці фіксували з 15-ї по 30-ту добу кожні 5 діб. В якості контролю використовували середовище МСР4 (табл. 2.2). Відсоток утворення пагонів визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили регенеранти, до загального числа експлантів.

2.2.6. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці в умовах *in vitro*

З метою одержання трансгенних рослин м’якої пшениці в якості вихідного матеріалу використовували 18-добовий калюс, отриманий з апікальних меристем, та 4–6-добовий калюс, одержаний з незрілих зародків пшениці сортів ‘Зимоярка’ та ‘Подольнка’. Калюс обробляли бактеріальною суспензією протягом 15 хв, потім просушували на фільтрувальному папері та переносили у чашки Петрі (близько 50 шт) на живильне середовище для кокультивування (Sidorov, Duncan, 2009). Кокультивування здійснювали

протягом 48 год у термостаті за температури 27 °С. Після цього експланти поміщали на модифіковане живильне середовище для регенерації MCR4 (Gorbatyuk et al., 2015), яке містило 100 мг/л паромоміцину (за використання вектора p014) або 5 мг/л фосфінотрицину (за використання векторної конструкції pCB203) в якості селективних агентів для попереднього відбору трансформантів. Культивування здійснювали за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду протягом 30-ти діб. Кожні 14 діб проводили пасажування на свіже регенераційне середовище.

Отримані регенеранти після первинної селекції переносили на живильне середовище для вкорінення MCR2 (табл. 2.2). Культивували за температури 24 °С і 16-годинного фотоперіоду у банках об'ємом 200 мл. Вкорінення тривало 2–3 тижні. Рослини з достатньо розвиненою кореневою системою адаптували до нестерильних умов, переносили в посудини з ґрунтом і культивували в умовах теплиці за температури 22–28 °С, вологості 70 % та природного освітлення.

2.2.7. Генетична трансформація пшениці методом *in planta*

Agrobacterium-опосередковану трансформацію *in planta* проводили в умовах вегетаційного досліду. Використовували рослини пшениці, отримані з насіння сортів 'Подільська' та 'Зимовська'. Для проведення трансформації обирали колоси довжиною 5–7 см, які ще не повністю вийшли з піхви прапорцевого листка (Agarwal et al., 2009; Zale et al., 2009). Проводили їх кастрування, залишаючи по 12–14 колосків на колос. Після цього на кожний колос вдягали індивідуальний ізолятор із пергаментного паперу та проводили етикетування. Через три доби проводили інокуляцію суспензією культури агробактерій, яку наносили на приймочки маточок за допомогою автоматичного дозатора. Після нанесення суспензії колоси знову ізолювали. Після повного висихання рідини, в якій було ресуспендовано агробактерії, проводили запилення пилом, отриманим з інтактного колоса тієї ж рослини.

2.2.8. Молекулярно-генетичний аналіз трансформованих рослин

Частину листків рослин пшениці покоління T_0 аналізували на наявність послідовностей генів *nptII*, *sgfp* і вірулентності агробактерій (за геном *VirC*) за використання полімеразної ланцюгової реакції. Загальну ДНК виділяли із листкового матеріалу рослин пшениці, трансформованих векторами p014 та pCB203 за допомогою *A. tumefaciens* в культурі *in vitro* та методом *in planta*, які імовірно містили гени *nptII* або *bar*.

Загальну РНК виділяли із листкового матеріалу рослин пшениці, трансформованих генетичними векторами p014 та pCB203. Перед використанням препаратів РНК проводили гідроліз залишкової ДНК. Для цього використовували ДНКазу I та 1–5 мкг загальної РНК. Реакційну суміш витримували 30 хв при 37 °С. Для зупинки реакції додавали 1 мкл 50 мМ ЕДТА та витримували 10 хв при 65 °С для денатурації ферменту ДНКазу I. Синтез кДНК здійснювали з використанням набору First Strand cDNA Synthesis Kit (Fisher Thermo Scientific) згідно інструкцій виробника. У випадку зворотної транскрипції використовували: 4 мкл 5× Reaction buffer, 1 мкл Oligo (dT)₁₈ 100 мкМ (0,5 мкг/мкл), 2 мкл 10 мМ еквімолярної суміші дНТФ, 5 мкл ($\approx$ 600 нг) РНК (реакційна суміш ДНКазної обробки), 0,5 мкл RiboLock RNase inhibitor, 40 од./мкл, 2 мкл Reverse transcriptase, 20 од./мкл. Реакційну суміш доводили до кінцевого об'єму 20 мкл деіонізованою водою Milli-Q. Визначення експресії трансгенів проводили шляхом ЗТ-ПЛР, використовуючи 2 мкл продуктів реакції ЗТ, доданих у 20 мкл реакційної суміші та специфічні праймери до кожного з генів (табл. 2.3).

Реакції ампліфікації проводили в термоциклерах Arctic Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) і Mastercycler gradient (Eppendorf).

Продукти ампліфікації розділяли в 1,2 % агарозному гелі, з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

2.2.9. Генетична трансформація кукурудзи

Для трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101, який містив вектори pCB133 (рис. 2.3) та pCB135.



Рис. 2.3. Схема вектора pCB133: RB, LB плечі Т-ДНК, Tnos – термінатор гена нопалінсинтази, Pnos – промотор гена нопалінсинтази, P35S – промотор гена вірусу мозаїки цвітної капусти, Tocs – термінатор гена октопінсинтази, TP – транзитний пептид, *epsps* – ген енолпірувілшикіматфосфатсинтази, *bar* – ген фосфінотрицинацетилтрансферази.

До складу векторів входили гени *cp4 epsps* під контролем промотора гена 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та гени – *bar*, продукт якого надає стійкість до фосфінотрицину, або *nptII*, продукт якого забезпечує стійкість до канаміцину, паромоміцину та інших аміноглікозидних антибіотиків, під контролем промотора нопалінсинтази, залежно від вектора (pCB133 містив ген *bar*, а pCB135 – ген *nptII*). *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію калюсу кукурудзи виконували за методикою (Sidorov, 2009). Після трансформації калюси переносили на модифіковане середовище N6, яке містило 5 мг/л фосфінотрицину, якщо використовували вектор pCB133, або 0,1 мМ гліфосату після трансформації вектором pCB135, та культивували у темряві при 27 °C. За два тижні калюси висаджували на свіжі середовища із фосфінотрицином і гліфосатом, де концентрація гліфосату була збільшена до 0,25 мМ, та вирощували за тих самих умов. Відібрані стійкі до гербіциду калюси пересаджували на регенераційне середовище MSGR (Sidorov, 2009), яке містило 0,25 мг/л БАП, 500 мг/л цефотаксиму та 5 мг/л фосфінотрицину, при використанні вектора pCB133, або 0,01 мМ гліфосату, якщо

використовували вектор pCB135, і культивували в умовах освітлення при температурі 24–26 °C та 14-годинному фотоперіоді. Через 6 тижнів культивування калюси переносили на регенераційні середовища з антибіотиком цефотаксимом. Індуковані пагони для укорінення були висаджені на безгормональне середовище МС, яке містило 500 мг/л цефотаксиму. Пагони, які утворили коріння, переносили в горщики з ґрунтом та вирощували в умовах теплиці.

Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи. Донорні рослини вирощували у польових умовах. Незрілі зародки через 10–12 діб після запилення ізолювали з донорних рослин, стерилізували та експлантували на живильне середовище для калюсогенезу *in vitro* (Нітовська та ін., 2012). Через 2–16 діб культивування зародки, на щитках яких почали розвиватися калюси, піддавали біолістичній трансформації. В експериментах використовували вектор pАНС25, який містить ген β -глюкуронідази *uidA* та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *bar*, обидва під контролем промотора убіквітину кукурудзи (рис. 2.4).

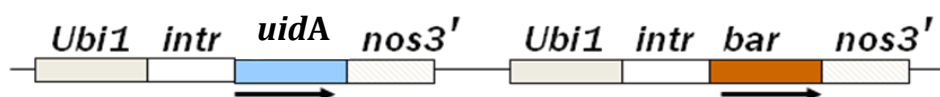


Рис. 2.4. Схема Т-ДНК векторної конструкції pАНС25, яка містить репортерний ген β -глюкуронідази (*uidA*) та селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що забезпечує стійкість трансформованих клітинних ліній до фосфінотрицину, обидва під контролем промоторів Ubi1 з інтронами *intr* та термінаторів *nos3'* (Christensen, 1996).

Пагони регенонованих рослин відокремлювали від калюсу та висаджували на селективне середовище. Паралельно проводили гістохімічний аналіз на експресію гена *uidA*. Рослинну ДНК аналізували методом ПЛР на наявність послідовності трансгена *bar*.

2.3. Молекулярно-генетичні методи

2.3.1. Виділення загальної ДНК з рослинного матеріалу

Нами створено колекцію загальної ДНК 160 сортів пшениці та 99 сортів ячменю. Окрім того, проведене виділення загальної ДНК селекційних ліній пшениці, на яких проводилася апробація та впровадження розроблених методичних підходів.

Було розглянуто два методи виділення ДНК – ЦТАБ метод та ЦТАБ-експрес метод, які передбачають використання лізуючого буфера, що забезпечує якісне переведення ДНК в розчин з мінімальними втратами. Відмінність між методиками полягає у складі вихідного буфера, наважки зразка, кількості ступенів очистки, тривалості та економічному ефекті.

Після виділення за допомогою ЦТАБ методу проводили спектрофотометричне та електрофоретичне дослідження загальної рослинної ДНК. Для визначення концентрації ДНК у зразках проводили спектрофотометричне вимірювання. Довжина хвилі 260 нм – є максимумом поглинання загальної ДНК; довжини хвиль 230 нм, 280 нм і 320 нм дозволяли аналізувати наявність небажаних домішок (білків та інших високомолекулярних сполук) у виділеній ДНК. Згідно отриманих результатів готували розведення ДНК з концентрацією 30 нг/мкл для проведення полімеразної ланцюгової реакції на референтні та цільові гени.

В усіх виділених зразках спостерігали наявність високомолекулярних фракцій ДНК та відсутність фракції РНК. Але для ЦТАБ методу було відмічено ряд недоліків, а саме висока тривалість (20 годин для сухого матеріалу), відносна вартість виділення, необхідність великої кількості матеріалу, які стають на перешкоді його використання для швидкого аналізу великої кількості зразків. Для подолання цих недоліків нами був використаний ЦТАБ-експрес метод (Stewart, Via 1993) з власними модифікаціями, який бездоганно дозволив аналізувати великі вибірки зразків пшениці та ячменю в зеленій (проростки, листки) та сухій (зерно, шрот,

борошно) масі.

По завершенні проводили електрофоретичне дослідження виділеної ДНК в 0,8 % агарозному гелі. При цьому визначали наявність високомолекулярних фракцій ДНК, які необхідні для ПЛР.

2.3.1.1. Виділення загальної ДНК ЦТАБ методом

Рослинний матеріал (200–300 мкг) переносили в стерильну ступку. Додавали 1 мл ЦТАБ-буфера (2 % ЦТАБ, 1,42 М NaCl, 20 мМ ЕДТА, 100 мМ Tris-HCl, рН 8,0) + 1,4 мкл 2-меркаптоетанолу. Додавали невелику кількість чистого стерильного піску. Розтирали зразок у ступці до світло-зеленої гомогенізованої маси. Переносили масу в 1,5 мл пробірки. Далі пробірки переносили на водяну баню, нагріту до температури 65 °С на 15 хв. Після інкубування, центрифугували пробірки при 12000 об/хв 5 хв на центрифугі Eppendorf Centrifuge 5418 до повного осадження нерозчинних залишків.

З пробірок переносили 700 мкл водної фази в нову пробірку. Додавали у пробірку 500 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1), добре перемішували. Потім пробірки центрифугували при 12000 об/хв 3 хв. Переносили 600 мкл водної фази в нову пробірку. Додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1) і добре перемішували. Центрифугували пробірки при 12000 об/хв 3 хв. Відбирали 400 мкл водної фази в нову пробірку. Додавали до отриманої водної фази 800 мкл буфера для преципітації, перемішували і залишали на 1 годину (або на ніч) при кімнатній температурі.

Після процесу осадження центрифугували пробірки при 12000 об/хв 5 хв. Зливали надосадову рідину та розчиняли осад в 1,2 М NaCl + 5 мкл 10 мг/мл РНКазі А. Добре перемішували пробірки протягом 15 хв в термошейкері при температурі 37 °С. Додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1), добре перемішували. Центрифугували пробірки при 12000 об/хв 3 хв.

Потім переносили 400 мкл водної фази в нову пробірку. Далі додавали 240 мкл ізопропанолу і добре перемішували. Центрифугували пробірки при 12000 об/хв 10 хвилин. Знову зливали надосадову рідину. Додавали 1 мл 70 % етанолу і добре піпеткою ресуспендували осад. Центрифугували пробірки при 12000 об/хв 5 хв. Потім дуже обережно зливали надосадову рідину. Знову центрифугували пробірки при 12000 об/хв 1–2 хвилини. Дуже обережно відбирали етанол, що залишився, піпеткою.

Підсушували осад під витяжкою протягом 1–2 хв. Далі розчиняли осад в 50 мкл ТЕ буфера pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). Отримані зразки очищеної ДНК зберігали при -20°C (Somma, 2006).

2.3.1.2. Виділення загальної ДНК ЦТАБ-експрес методом

Рослинний матеріал зразка масою 0,03–0,04 г переносили у мікроцентрифужну пробірку Eppendorf на 1,5 мл. Додавали 600 мкл підігрітого до 70°C буфера ЦТАБ (2 % ЦТАБ; 1,42 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 % PVP-40; 5 mM аскорбінова кислота; 4,0 mM DIECA (Diethyldithiocarbamic acid)). Перемішували на шейкері Eppendorf Thermomixer comfort 1 хв. До отриманої суміші додавали 500 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Змішували 5 хв при 500 об/хв на орбітальному шейкері Microshaker type ML-1. Відцентрифугувували на центрифугі Eppendorf Centrifuge 5418 на 12000 об/хв 5 хв. Відбирали 200 мкл верхньої водної фази, що містить ДНК, та переносили її у чисту пробірку. Додавали 140 мкл (0,7 об'єму відібраної кількості водної фази ДНК) ізопропанолу, перемішували і залишали на 5 хв за кімнатної температури. Осаджували у мікроцентрифугі при 12000 об/хв 20 хв. Зливали супернатант і додавали 800 мкл 70 % етанолу. Ресуспендували. Відцентрифугувували 5 хв при 12000 об/хв. Обережно зливали супернатант. Осаджували 2 хв і відбирали дозатором залишки етанолу. Осад підсушували за температури

55 °C 5 хв і розчиняли ДНК у 100 мкл TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) (Stewart, Via, 1993).

2.3.2. Спектрофотометричне вимірювання загальної рослинної ДНК

Готували розведення зразків та контроль. Для приготування зразка в пробірку вносили 95 мкл деіонізованої води Milli-Q (Merck Millipore) та додавали 5 мкл препарату загальної ДНК. Потім добре перемішували. Для приготування контролю в пробірку вносили 95 мкл води і додавали 5 мкл ТЕ буфера (pH 8,0). Вимірювання концентрації здійснювали на фотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35 згідно інструкції виробника. Відповідно до отриманих даних проводили нормалізацію зразків загальної ДНК до 30 нг/мкл.

2.3.3. Праймери, які застосовувалися у дослідженні

Список праймерів, які були використані при проведенні аналізу алельного складу локусів генів господарсько-цінних ознак та інших корисних генів, наведено в табл. 2.3. Олігонуклеотиди синтезовані компанією Metabion (Німеччина) у кількості 0,02 мкМ із стандартним очищенням від солей. Маточні розчини праймерів готували концентрацією 100 мкМ у стерильному ТЕ буфері pH 8,0, а робочі – у концентрації 10 мМ декількома аліквотами і зберігали за температури –20 °C.

Таблиця 2.3

Перелік праймерів, які використовували у дослідженнях

№	Назва, нуклеотидна послідовність, посилання	Розмір амплікону, п.н.	Цільовий ген, алель/локус
Референтні гени			
1	TaG3PDHF, 5'-CAACG CTAGC TGCAC CACTA ACT-3' TaG3PDHR, 5'-ACTCC TCCTT GATAG	604 –для ДНК; 300 – для РНК	<i>ga3pdh</i> – гліцер-альдегід-3-фосфат дегідрогеназа

№	Назва, нуклеотидна послідовність, посилання	Розмір амплікону, п.н.	Цільовий ген, алель/локус
	CAGCCTT-3' (Kim et al., 2008)		пшениці (Genbank accession FN429985) та ячменю (Genbank accession M36650)
2	TaActinLP, 5'-GAGGG ATACA CGCTT CCTCA-3' TaActinRP, 5'-GAAAG TGCTA AGAGA GGCCA AA-3' (Himi et al., 2011)	547	<i>actin</i> – пшениці (Genbank accession AB181991)
3	RTF, 5'-AAGGG TTGCT CCTCT TCGCG ATCTTG-3' RTR, 5'-GTACA TGCCA GCACC GTATG GATTG-3' (Степаненко, 2011; Kim et al., 2008; Моргун, 2013)	934	<i>TaTM20</i> – білок-транспорттер іонів металів пшениці (Genbank accession DQ323065)
Гени високомолекулярних глютенінів пшениці			
4	MAR-F, 5'-CCTCA GCATG CAAAC ATGCA GC-3' MAR-R, 5'-CTGAA ACCTT TGGCC AGTCA TGTC-3' (Butow et al., 2004)	563 – <i>Glu-B1a1</i> ; 520 – будь-який інший алель локусу	Алель <i>Glu-B1a1</i>
5	UMN19F, 5'-CGAGA CAATA TGAGC AGCAAG-3' UMN19R, 5'-CTGCC ATGGA GAAGT TGGA-3' (Liu et al., 2008)	344 – <i>Glu-A2*</i> ; 362 – <i>Glu-A1</i> , <i>Glu-A null</i>	<i>Glu-A1</i> – алель 2*
6	UMN25F, 5'-GGGAC AATAC GAGCA GCAAA-3' UMN25R, 5'-CTTGT TCCGG TTGTT GCCA-3' (Liu et al., 2008)	299 – <i>Glu-D1x2</i> ; 281 – <i>Glu-D1x5</i>	<i>Glu-D1</i> – алелі <i>Dx2</i> та <i>Dx5</i>
7	UMN26F, 5'-CGCAA GACAA TATGA GCAAAC-3' UMN26R, 5'-TTGCC TTTGT CCTGT GTGC-3' (Liu et al., 2008)	397 – <i>Glu-D1y10</i> ; 415 – <i>Glu-D1y12</i>	<i>Glu-D1</i> – алелі <i>Dy10</i> та <i>Dy12</i>
Пшенично-житні транслокації			
8	1Rs1F, 5'-TAGCA CCACT CGCTC TCTCA-3' 1Rs1R, 5'-TTTCC CATCA GAAAA ATCGC-3' (Сиволап и др., 2011; Khlestkina et al., 2004)	290	<i>Xrems 1303</i> – 1RS транслокації
9	sec1F, 5'-CCTTC CTCAT CTTTG TCCTC-3' sec1R, 5'-GCTCT GGTCT CTGGG GTTGT-3' (Сиволап и др., 2011; Chai et al., 2006)	400	<i>Sec-1</i> – 1RS транслокації
10	SCM9-F, 5'-TGACA ACCCC CTTTC CCTCGT-3' SCM9-R, 5'-TCATC GACGC TAAGG AGGACCC-3' (Saal, Wricke, 1999)	226 – <i>1AL.1RS</i> ; 202 – <i>1BL.1RS</i> –	<i>SCM9</i> – тип транслокації
11	PawS5F, 5'-AACGA GGGGT TCGAG GCC-3' PawS6R, 5'-GAGTG TCAAA CCCAA CGA-3' (Rogowsky et al., 1992)	233, 338 – <i>1AL.1RS</i>	Транслокація <i>1AL.1RS</i>

№	Назва, нуклеотидна послідовність, посилання	Розмір амплікону, п.н.	Цільовий ген, алель/локус
Гени <i>Pro-A1</i> та <i>Pro-D1</i> пшениці			
12	PPO33F, 5'-CCAGA TACAC AACTG CTGGC-3' PPO33R, 5'-TGATC TTGAG GTTCT CGTCG-3' (He et al., 2007)	290 – <i>Pro-A1a</i> ; 481 – <i>Pro-A1b</i>	Алелі гена <i>Pro-A1</i> пшениці
13	PPO29F, 5'-TGAAG CTGCC GGTCA TCTAC-3' PPO29R, 5'-AAGTT GCCCA TGTCC TCGCC-3' (He et al., 2007)	490 – <i>Pro-D1b</i>	Алель гена <i>Pro-D1</i> пшениці
Пуринолінові гени пшениці			
14	Pina-D1F, 5'-CCCTG TAGAG ACAAA GCTAA-3' Pina-D1R, 5'-TCACC AGTAA TAGCC AATAGTG-3' (Gautier et al., 1994)	330 – <i>Pina-D1a</i> ; відсутність амплікону – <i>Pina-D1b</i>	<i>Pina-D1</i>
15	Pinb-D1F, 5'-ATGAA GACCT TATTC CTCCTA-3' Pinb-D1R, 5'-TCACC AGTAA TAGCC ACTAG GGAA-3' (Gautier et al., 1994)	Після рестрикції MbiI (BsrBI): 320 – <i>Pinb-D1a</i> ; 200 – <i>Pinb-D1b</i>	<i>Pinb-D1</i>
НAW, трансгени, що зумовлюють високий вміст амілози у зерні пшениці			
16	SBEIIaF, 5'-CGGCG CAACC TGAAG AATTAC-3' SBEIIaR, 5'-TCTGC CCATC TCCTG GTTTT-3' (CLC Main Workbench (version 6.9.2) 2013)	210 + 485 – трансгенні рослини; 485 – дикий тип	<i>SBEIIa</i> – ген синтезу крохмалю розгалужувального ферменту
17	SBE-BarF, 5'-CATCG AGACA AGCAC GGTCA-3' SBE-BarR, 5'-GAAAC CCACG TCATG CCAGT-3' (Sestili et al., 2010)	405	<i>bar</i> – ген стійкості до фосфіотрицину
Гени <i>waxy</i> пшениці			
18	Wx-D1F, 5'-GCCGA CGTGA AGAAG GTGGTG-3' Wx-D1R, 5'-CCCCT TCGGT CATTG GTTGTGT-3' (Vrinten et al., 1999)	930 – <i>Wx-D1a</i> ; 342 – <i>Wx-D1b</i>	<i>Wx-D1</i> – ген синтезу амілози
Гени синтезу каротиноїдів пшениці			
19	YP7AF, 5'-GGACC TTGCT GATGA CCGAG-3' YP7AR, 5'-TGACG GTCTG AAGTG AGAATGA-3' (He et al., 2008); (McIntosh et al., 2013).	194 – <i>Psy-A1a</i> ; 231 – <i>Psy-A1b</i>	Алелі <i>a</i> та <i>b</i> гена <i>Psy-A1</i>
20	YP7A2F, 5'-GCCAG CCCTT CAAGG ACATG-3' YP7A2R, 5'-CAGAT GTCGC CACAC TGCCA-3' (He et al., 2009)	1686 – <i>Psy-A1a</i> ; 1686 – <i>Psy-A1b</i> ; 1001 – <i>Psy-A1c</i>	Алелі <i>a</i> , <i>b</i> та <i>c</i> гена <i>Psy-A1</i>
21	YP7B-1F, 5'-GCCAC AACTT GAATG TGAAAC-3' YP7B-1R, 5'-ACTTC TTCCA TTTGA ACCCC-3' (He et al., 2009)	151 – <i>Psy-B1a</i> ; 156 – <i>Psy-B1b</i>	Алелі <i>a</i> та <i>b</i> гена <i>Psy-B1</i>
22	YP7B-2F, 5'-GCCAC CCACT GATTA	428 – <i>Psy-B1c</i>	Алель <i>c</i> гена <i>Psy-B1</i>

№	Назва, нуклеотидна послідовність, посилання	Розмір амплікону, п.н.	Цільовий ген, алель/локус
	CCACTA-3' YP7B-2R, 5'-CCAAG GTGAG GGTCT TCAAC-3' (He et al., 2009)		
23	YP7B-3F, 5'-GAGTA AGCCA CCCAC TGATT-3' YP7B-3R, 5'-TCGCT GAGGA ATGTA CTGAC-3' (He et al., 2009)	884 – <i>Psy-B1d</i>	Алель <i>d</i> гена <i>Psy-B1</i>
24	YP7B-4F, 5'-AGGTA CCAGC CAGCC CATA-3' YP7B-4R, 5'-CTCGT CAAAG TTCGT GTACC-3' (He et al., 2009)	716 – <i>Psy-B1e</i>	Алель <i>e</i> гена <i>Psy-B1</i>
25	YP7D-2F, 5'-ACTCC CACAA ACCTA CAACG-3' YP7D-2R, 5'-ACGCT CATCA ACCCC ACG-3' (Wang et al., 2009)	967 – <i>Psy-D1a</i> ; 1046 – <i>Psy-D1g</i>	Алелі <i>a</i> та <i>g</i> гена <i>Psy-D1</i>
Праймери для IRAP-аналізу пшениці, ретротранспозони			
26	C0699, 5'-CGCTC CAGCG GACTT GCC-3' (Bento et al., 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Nikita
27	C0945, 5'-GCAAG CTTCC GTTTC CGC-3' (Bento et al., 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Sabrina
28	Stowaway, 5'-CTTAT ATTTA GGAAC GGAGG GAGT-3' (Bento et al., 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Stowaway
29	9900, 5'-GATAG GGTCG CATCT TGGGC GTGAC-3' (Bento et al., 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Sukkula
30	2123, 5'-GGAAA AGTAG ATACG ACGGA GACGT-3' (Bento et al. 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Wham
31	2107, 5'-AGCAT GATGC AAAAT GGACG TATCA-3' (Bento et al., 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Wilma
32	2106, 5'-TAATT TCTGC AACGT TCCCC AACA-3' (Bento et al., 2008; Trebichalský et al., 2013)	Варіабельний	Ретротранспозон Wis2
Праймери для REMAP-аналізу пшениці			
33	9900 Sukkula 5'-GATAG GGTCG CATCT TGGGC GTGAC-3' (Khalil et al., 2016; Werner et al., 2015; Bayram et al., 2012)	Варіабельний	LTR- ретротранспозону Sukkula
34	HB10, 5'-GAGAG AGAGA GACC-3' (Khalil et al., 2016; Werner et al., 2015; Bayram et al. 2012)	Варіабельний	Мікросателітні локуси пшениці
35	A17898, 5'-CACAC ACACA CAAC-3' (Khalil et al., 2016; Werner et al., 2015; Bayram et al., 2012)	Варіабельний	Мікросателітні локуси пшениці
36	B17899, 5'-CACAC ACACA CAGG-3' (Khalil et al., 2016; Werner et al., 2015; Bayram et al., 2012)	Варіабельний	Мікросателітні локуси пшениці
37	UBC890, 5'-VHVGT GTGTG TGTGT-3'	Варіабельний	Мікросателітні

№	Назва, нуклеотидна послідовність, посилання	Розмір амплікону, п.н.	Цільовий ген, алель/локус
	(Khalil et al., 2016; Werner et al., 2015; Bayram et al., 2012)		локуси пшениці
Селективні гени			
38	PSGA, 5'-GAGGC TATTC GGCTA TGACTG-3' PSGB, 5'-CAAGC TCTTC AGCAA TATCA CG-3' (Demeke et al., 1999)	647	<i>nptII</i>
39	SBE F, 5'-CATCG AGACA AGCAC GGTCA-3' SBE R, 5'-GAAAC CCACG TCATG CCAGT-3' (Sestili et al., 2010)	405	<i>bar</i>
Репортерні гени			
40	gfp2F, 5'-CAGCG TGAAC GGCCA CAAGT TCA-3' gfp2R, 5'-CGATG CGGTT CACCA GGGTGT-3' (власний дизайн)	311	<i>sgfp</i>
Гени агробактерії			
41	VCF, 5'-ATCAT TTGTA GCGACT-3' VCR, 5'-AGCTC AAACC TGCTTC-3' (Sawada et al., 1995)	720	<i>VirC</i>

2.3.4. Проведення полімеразної ланцюгової реакції

При проведенні полімеразної ланцюгової реакції використовували стандартний склад реакційної суміші, наведений у табл. 2.4, і притримувалися стандартних методик та рекомендацій виробників реактивів. Разом з тим для кожного конкретного маркера чи об'єкта досліджень проводили попередні оптимізації, які зазначені нижче.

Для оптимізації ряду реакцій використовували техніку низхідної (Touchdown) ПЛР (Rubie et al., 1999). Розділення продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в агарозному (1,2 %) гелі з використанням літій-боратного буфера (Sambrook, Russell 2001). Візуалізацію результатів здійснювали в УФ-світлі та фіксували з використання фотосистеми на основі цифрового фотоапарату Canon EOS 600D.

Таблиця 2.4

Склад суміші для полімеразної ланцюгової реакції

Концентрація, назва реактиву	Функція в реакції	Об'єм, мкл
10 мкМ F (залежно від гена)	Прямий праймер	0,1–1,0*
10 мкМ R (залежно від гена)	Зворотний праймер	0,1–1,0*
2 мМ дНТФ	Суміш дезоксинуклеотидтрифосфатів	2,0
10x буфер	Реакційний буфер з іонами Mg^{2+} або ж вони додавалися окремо	2,0
од/мкл DNA Polymerase	Термостабільна ДНК полімераза (DreamTaq DNA Polymerase виробництва Thermo Fisher Scientific або FIREPol® DNA Polymerase компанії Solis BioDyne)	0,1–0,15
Milli-Q	Деіонізована вода I типу очистки (Merck Millipore)	До загального об'єму 20 мкл
30 нг/мкл загальної ДНК	Матриця, очищена ДНК	1,0

Примітка: * – концентрація праймерів у окремих реакціях наведена для кожної програми далі.

Таблиця 2.5

Умови проведення ампліфікації для окремих генів

Ген, маркер	Денатурація, гібридизація, синтез, кількість циклів	Концентрація праймерів у реакції, мкМ
<i>virD1</i>	94 °C 30 с, 57 °C 1 хв, 72 °C 15 с, 30 х	0,5 мкМ
<i>virC</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 45 с, 30 х	0,4 мкМ
<i>nptII</i>	94 °C 30 с, 53 °C 30 с, 72 °C 30 с, 30 х	0,35 мкМ
<i>prol-ex1</i>	94 °C 30 с, 53 °C 30 с, 72 °C 35 с, 30 х	0,5 мкМ
<i>prol-int1</i>	94 °C 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 45 с, 30 х	0,6 мкМ
<i>bar</i>	94 °C 30 с, 59 °C 1 хв, 72 °C 18 с, 30 х	0,5 мкМ
<i>ga3pdh</i>	94 °C 30 с, 57 °C 30 с, 72 °C 39 с, 34 х	0,4 мкМ
<i>actin</i>	94 °C 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 20 с, 34 х	0,5 мкМ
<i>TaTM20</i>	94 °C 30 с, 63 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,5 мкМ
<i>Glu-B1al</i> + <i>TaTM20</i>	94 °C 30 с, 61 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,5 мкМ + 0,25 мкМ
<i>Glu-A1 2*</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34 х	0,5 мкМ
<i>Glu-D1 5</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,5 мкМ
<i>Glu-D1 10</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,5 мкМ
<i>Glu-D1 5</i> + <i>Glu-D1 10</i> + <i>actin</i>	94 °C 30 с, 61 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,75 мкМ + 1,0 мкМ + 0,15 мкМ
<i>PPO33</i> + <i>TaTM20</i>	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,5 мкМ + 0,25 мкМ
<i>PPO29</i> + <i>TaTM20</i>	94 °C 30 с, 68 °C (з кожним циклом температура зменшується на 1 °C) 30 с, 72 °C 1 хв, 8 х; 94 °C 30 с, 61 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 24 х; низхідна ПЛР	0,5 мкМ + 0,3 мкМ
<i>Itr1 (1)</i> + <i>ga3pdh</i>	94 °C 30 с, 61 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34 х	0,5 мкМ + 0,5 мкМ

Ген, маркер	Денатурація, гібридизація, синтез, кількість циклів	Концентрація праймерів у реакції, мкМ
<i>Itr1 (2) + ga3pdh</i>	94 °C 30 с, 62 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34 х	0,5 мкМ + 0,5 мкМ
<i>Bmy1</i>	94 °C 30 с, 62 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34 х	0,5 мкМ
IRAP	94 °C 30 с, 55 °C 1 хв, 72 °C 3 хв, 34 х	0,7 мкМ
Sukkula + HB10	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 3 хв, 34 х	0,5 мкМ + 0,5 мкМ
Sukkula + A17898	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 3 хв, 34 х	0,5 мкМ + 0,3 мкМ
Sukkula + B17899	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 3 хв, 34 х	0,5 мкМ + 0,5 мкМ
Sukkula + UBC890	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 3 хв, 34 х	0,4 мкМ + 0,6 мкМ
Sukkula + UBC864	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 3 хв, 34 х	0,5 мкМ + 0,5 мкМ
<i>Gpc-B1</i>	94 °C 30 с, 65 °C 30 с (декремент 1 °C/х), 72 °C 20 с, 10 х; 94 °C 30 с, 55 °C 20 с, 72 °C 20 с, 25 х	0,5 мкМ
<i>Xgwm508</i>	94 °C 30 с, 54 °C 30 с, 72 °C 30 с, 35 х	0,5 мкМ
<i>Xgwm193</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 25 с, 35 х	0,5 мкМ
<i>Xgwm626</i>	94 °C 30 с, 50 °C 30 с, 72 °C 25 с, 35 х	0,5 мкМ
<i>Xgwm219</i>	94 °C 30 с, 62 °C 30 с, 72 °C 25 с, 35 х	0,5 мкМ
<i>Pina-D1</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 40 с, 34 х	0,5 мкМ
<i>Pinb-D1</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34х	0,5 мкМ
Змінений склад крохмалю	94 °C 30 с, 61 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,25 мМ
Каротиноїди <i>Psy1</i>	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34 х	0,25 мМ
<i>nptII</i>	94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 40 с, 34 х	0,5 мкМ
<i>sgfp</i>	94 °C 30 с, 68 °C 45 с (декремент 1 °C/х), 72 °C 30 с, 7 х; 94 °C 30 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с, 25 х	0,5 мкМ
<i>VirC</i>	94 °C 30 с, 59 °C 30 с, 72 °C 30 с, 34 х	0,5 мкМ
<i>bar</i>	94 °C 30 с, 65 °C 30 с, 72 °C 1 хв, 34 х	0,5 мкМ
<i>TaG3PDH</i>	94 °C 30 с, 58 °C 30 с, 72 °C 30 хв, 34 х	0,5 мкМ

Примітки: Кожна програма циклічної ампліфікації починалася з одного циклу денатурації ДНК матриці 94 °C протягом 3 хв, а після кількох десятків специфічних циклів наведених у таблиці завершувалася кінцевою елонгацією 72 °C протягом 5 хв та охолодженням 20 °C на 1 хв. Літера «х» позначає цикл, в той час як знак «+» – мультиплексні реакції.

Умови проведення ПЛР для кожного маркера оптимізували у кожному випадку (табл. 2.5). Використовували термоциклери Arctic Thermal Cycler виробництва Thermo Fisher Scientific та Mastercycler gradient компанії Eppendorf з розігрівом кришок до 105 градусів.

2.3.5. Визначення господарсько-корисних генів

Визначення гена *Grc-B1*. Методика електрофорезу глютенінів в ПАГ, що використовувалася для дослідження, була наступна. Спочатку проводили підготовку зразків. Одну зернівку пшениці розмелювали та переносили в пробірку. Додавали 400 мкл екстрагуючого буферу і залишали на 24 год. Збирали систему для заливання гелю. Брали два скла, спейсери і гребінку з необхідною кількістю лунок для зразків. Між двома скляними пластинками затискали спейсери і встановлювали систему у вертикальне положення. Готували перший гель для розділення. На 45 мл гелю необхідно 18,75 мл 30 % АА, 4,65 мл 1 % БАА, 11,25 мл БМ Tris (pH 8,7), 9,75 мл H₂O, 0,45 мл 10 % SDS, 200 мкл ПСА і 20 мкл TEMED. Приготований гель обережно заливали в систему скелець і чекали поки полімеризується. Гелем для розділення заливали систему на 70 % і залишали місце для концентруючого гелю. Гель для концентрування готували так: на 15 мл гелю необхідно 1,87 мл Tris (pH 6,8), 1,95 мл 1 % БАА, 2,5 мл АА 30 %, 8,4 мл H₂O, 0,15 мл 10 % SDS, 150 мкл ПСА і 15 мкл TEMED. Приготованим гелем заповнювали систему доверху, вставляли гребінку і чекали полімеризації.

Після повної полімеризації гелю виймали гребінку з системи, а вологу, що залишилася, вбирали фільтрувальним папером. Зразки перед нанесенням кип'ятили 3 хв. В лунки вносили по 11–14 мкл зразка. Простір над лунками заливали електрофорезним буфером. Встановлювали гелеву систему в камеру і наповнювали верхню і нижню камери електрофорезним буфером. Вмикали блок живлення та встановлювали напругу спочатку 20 В, поки зразки не зайдуть у слоти, потім піднімали напругу до 30 В, поки не вийдуть зразки з концентруючого гелю і далі збільшували до 60 В до кінця проходження розділяючого гелю. Після закінчення прогонки систему розбирали, а гель переносили у ванночку для фарбування і залишали на 12 год. Після фарбування гель переносили у ванночку з дистильованою водою і відмивали протягом 12 год.

Для проведення електрофорезу гліадинів у ПАГ застосовували наступну методику. Зразки готували у такий спосіб. Розмелювали одну зернівку пшениці та переносили у пробірку. Додавали 400 мкл 70 % етанолу і залишали на 12 год для екстрагування білків. З пробірки через 12 год відбирали 80–100 мкл надосадової рідини. Відібрані зразки ставили до сухожарної шафи на 60 °С, для випаровування спирту. До висушеної проби додавали 80–100 мкл 5,5 М сечовини. Збирали систему для заливання гелю. Використовували два скла, спейсери і гребінку з необхідною кількістю лунок для зразків. Між двома скляними пластинками затискали спейсери і встановлювали систему у вертикальне положення. Готували перший розділяючий гель. На 25 мл гелю брали 5,5 мл MMS, 16,9 мл 4,44 М сечовини, 1,5 мл оцтової кислоти, 1,125 мл H₂O, 100 мкл ПСА і 10 мкл ТЕМЕД. Приготований гель обережно заливали в систему і чекали поки він заполімеризується. Розділяючим гелем заливали систему на 70 % і залишали місце під концентруючий гель. Готували концентруючий гель. На 15 мл гелю необхідно було 2,125 мл SGB, 1,963 мл MSS, 8,4 мл 4,44 М сечовини, 150 мкл ПСА і 15 мкл ТЕМЕД. Приготованим гелем заповнювали систему на 100 %, вставляли гребінку і чекали полімеризації.

Після повної полімеризації гелів виймали гребінку, а вологу, що залишалася, вбирали фільтрувальним папером. В лунки вносили по 20–25 мкл зразка. Простір над лунками заливали електрофорезним буфером. Встановлювали систему в камеру і наповнювали верхню і нижню камери електрофорезним буфером. Вмикали блок живлення, встановлювали напругу спочатку 150 В на 30 хв, потім піднімали напругу до 450 В до кінця проходження розділяючого гелю. Робили два прогони фарбника.

Після закінчення пробігу систему розбирали, а гель переносили у ванночку для фарбування і залишали на 12 годин. Після фарбування гель переносили у ванночку з дистильованою водою і відмивали впродовж 12 год.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу у 2 % та 2,5 % агарозних гелях, з додаванням бромистого етидію в якості

барвника та використовуючи літій-боратний буфер. Візуалізацію продуктів ампліфікації здійснювали в ультрафіолетовому світлі та фіксували за допомогою фотосистеми Canon EOS 600D.

Визначення генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Виділення загальної рослинної ДНК проводили із зеленого матеріалу чи зернівок модифікованим ЦТАБ методом згідно (Stewart, Via, 1993). Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі, натрій-боратному та літій-боратному буферах з 0,5 мг/мл бромистого етидію.

З метою кращого диференціювання отриманих продуктів реакції після проведення ампліфікації гена *Pinb-D1* проводили гідроліз ПЛР-продукту ендонуклеазою рестрикції MbiI (BsrBI) протягом 3 год за температури 37 °C. Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу в агарозному гелі, літій-боратному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію в якості барвника (Brody, Kern, 2004).

Візуалізацію результатів проводили на транслюмінаторі в УФ-світлі. Документування здійснювали фотосистемою Canon EOS 600D. Цифрові зображення обробляли програмним забезпеченням GIMP та MS PowerPoint.

Зерно для фізичної детекції розмелювали на лабораторному млині Perten LM 3100 (Швеція). Показник твердозерності визначався методом інфрачервоної спектроскопії в близькому діапазоні випромінювань (NIRS) у борошні пшениці на приладі Perten Inframatic 8600 (Швеція). Для статистичного аналізу даних застосовували стандартні функції із програмного оточення для мови програмування R версії 3.3.2 (R Core Team 2016).

2.3.6. Визначення пшенично-житніх транслокацій

Виділення сумарної ДНК проводили із 4-добових етіолованих проростків, використовуючи набір реагентів «ДНК-сорб-С» («AmpliSens», РФ). Наявність пшенично-житньої транслокації визначали методом ПЛР.

Праймери, що є маркерами до локусів *Xrems 1303* та *ω-secalin* у геномі пшениці, та умови проведення ПЛР-аналізу відповідали рекомендаціям авторів (Khlestkina et al., 2004; Chai et al., 2006; Сиволап та ін., 2011).

В якості внутрішнього контролю для полімеразної ланцюгової реакції використовували праймери до гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*G3PDH*) – форвардний 5'-TCA CCA CCG AGT ACA TGA CC-3' та реверсний 5'-TCG TCC TTG AGC TTG ATG T-3' (Kim, et al., 2008), розмір амплікону 604 п.н. Реакційна суміш включала: по 10 мкМ форвардного та реверсного праймерів, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x DreamTaq™ Green Buffer (Fermentas), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Fermentas), 1 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas), 50 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл. Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили у термоциклері Mastercycler Personal 5332 Eppendorf за такою програмою: первинна денатурація становила 94 °С 4 хв та 35 циклів: денатурація – 94 °С 30 с, реасоціація – 57 °С 30 с, елонгація – 72 °С 35 с, кінцева елонгація – 72 °С 10 хв. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,2 %-ому агарозному гелі з додаванням 2,5 мкг/мл бромистого етидію в 0,5x TBE (трис-боратному) буфері, напруга становила 5 В/см протягом 1,5 год (Sambrook et al., 2001). Маркер молекулярної маси – GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Негативний контроль – без додавання матриці ДНК (TE буфер).

Для виявлення локусу *Xrems 1303* застосовували праймери – 5'-TAG CAC CAC TCG CTC TCT CA-3' (F) та 5'-TTT CCC ATC AGA AAA ATC GC-3' (R), розмір очікуваного амплікона – 290 п.н. Реакційна суміш включала: по 10 мкМ форвардного та реверсного праймерів, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x DreamTaq™ Green Buffer (Fermentas), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Fermentas), 1 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas), 50 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл. Ампліфікацію фрагментів ДНК проводили у термоциклері Mastercycler Personal 5332 Eppendorf за такою програмою:

первинна денатурація становила 94 °C 4 хв та 35 циклів: денатурація – 94 °C 30 с, реасоціація – 52 °C 30 с, елонгація – 72 °C 23 с, кінцева елонгація – 72 °C 10 хв (Сиволап та ін., 2011). Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,6 %-ому агарозному гелі з додаванням 2,5 мкг/мл бромистого етидію в 0,5x TBE (трис-боратному) буфері, напруга становила 5 В/см протягом 1,5 год (Sambrook et al., 2001). Маркер молекулярної маси – GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas). Негативний контроль – без додавання матриці ДНК (TE буфер).

Наявність локусу *ω-secalin* визначали, застосовуючи праймери – 5'-CCT TCC TCA TCT TTG TCC TC-3' (F) та 5'-GCT CTG GTC TCT GGG GTT GT-3' (R), розмір очікуваного амплікона – 400 п.н. Склад реакційної суміші для ПЛР використовували такий, як зазначено вище. Умови ампліфікації: первинна денатурація – 94 °C 4 хв та 35 циклів: денатурація – 94 °C 45 с, реасоціація – 65 °C 1 хв, елонгація – 72 °C 1 хв 30 с, кінцева елонгація – 72 °C 10 хв (Сиволап та ін., 2011). Продукти ПЛР виявляли електрофоретично у 1,2 %-ому агарозному гелі з додаванням 2,5 мкг/мл бромистого етидію в 0,5x TBE буфері (Sambrook et al., 2001).

В якості внутрішнього контролю в мультиплексних полімеразних ланцюгових реакціях використовують різні гени. В нашій роботі використовували праймери до гена *TaTM20* та локусу *Xrems 1303*. Для виявлення гена *TaTM20* застосовували наступні праймери 5'-AAG GGT TGC TCC TCT TCG CGA TCT TG-3'(F) та 5'-GTA CAT GCC AGC ACC GTA TGG ATT G-3'(R) (Kim et al., 2008). Реакційна суміш включала: по 10 мкМ форвардного та реверсного праймерів до локусу *Xrems 1303*, по 7 мкМ форвардного та реверсного праймерів до гена *TaTM20*, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x DreamTaq™ Green Buffer (Fermentas), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Fermentas), 1 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas), 50 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл. Використовували оригінальні умови ампліфікації: первинна денатурація – 94 °C 4 хв, 9 циклів: денатурація –

94 °C 30 с, реасоціація – 64 °C (зі зниженням на 1 °C в кожному циклі) 30 с, елонгація – 72 °C 21 с та 25 циклів: денатурація – 94 °C 30 с, реасоціація – 54 °C 30 с, елонгація – 72 °C 21 с, кінцева елонгація – 72 °C 5 хв. Продукти ПЛР виявляли електрофоретично в 1,2 %-ному агарозному гелі з додаванням 2,5 мкг/мл бромистого етидію в 0,5x TBE буфері (Sambrook et al., 2001).

Для мультиплексної ПЛР на локус *Sec-1* використовували праймери до локусу *ω-secalin* та гена *TaTM20*, що описані вище. Реакційна суміш включала: по 10 мкМ форвардного та реверсного праймерів до локусу *ω-secalin*, по 5 мкМ форвардного та реверсного праймерів до гена *TaTM20*, по 2 мкл буфера для ПЛР 10x DreamTaq™ Green Buffer (Fermentas), по 0,2 мМ кожного дезоксирибонуклеотид-3-фосфата (Fermentas), 1 од. полімерази DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas), 50 нг сумарної ДНК, деіонізовану воду Milli-Q до кінцевого об'єму 20 мкл. Умови ампліфікації: первинна денатурація – 94 °C 4 хв та 34 цикли: денатурація – 94 °C 30 с, реасоціація – 65 °C 1 хв, елонгація – 72 °C 27 с, кінцева елонгація – 72 °C 5 хв (Сиволап та ін., 2011). Продукти ПЛР виявляли електрофоретично в 1,2 %-ному агарозному гелі з додаванням 2,5 мкг/мл бромистого етидію в 0,5x TBE буфері (Sambrook et al., 2001).

У дослідженнях використовували понад 100 сортів пшениці української та зарубіжної селекції. Виділення загальної ДНК проводили за допомогою модифікованого ЦТАБ методу із зеленої маси та зернівок (Stewart, Via, 1993). Для мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з метою визначення хромосомної локалізації транслокацій використовували праймери SCM9F і SCM9R до мікросателітного локусу *SCM9* жита (1RS плече) (Saal, Wricke, 1999), та праймери до референтного гена пшениці *TaTM20* (Kim et al., 2008). Режим ампліфікації: первинна денатурація – 94 °C – 3 хв та 34 цикли: денатурація – 94 °C – 30 с, реасоціація – 60 °C – 30 с, елонгація – 72 °C – 1 хв, кінцева елонгація – 72 °C – 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізовували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 2 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм. За наявності 1AL.1RS очікували

амплікон 226 п.н., 1BL.1RS – 206 п.н., за відсутності транслокації – сигналу не спостерігали.

Проводили мультиплексну ПЛР з використанням пари цільових праймерів PAWS5 та PAWS6 (Rogowsky et al., 1992) та праймера до референтного гена пшениці *act* (Kim et al., 2008). Режим ампліфікації: первинна денатурація – 94 °C – 3 хв та 34 цикли : денатурація – 94 °C – 30 с, реасоціація – 61 °C – 30 с, елонгація – 72 °C – 24 с, кінцева елонгація – 72 °C – 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізовували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 1,2 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм. За наявності транслокації 1AL.1RS очікували амплікон 233 п.н. та 338 п.н. – у випадку 1BL.1RS, за відсутності транслокації – сигналу не спостерігали.

2.3.7. Проведення електрофорезу ДНК в агарозному гелі

Використовували як класичну систему, засновану на буферах з високим осмотичним тиском з включенням EDTA, так і більш сучасну на низькосольових електрофоретичних буферах (Brody, Kern, 2004). Готували агарозний гель концентрацією 0,8 %, 1,2 %, 1,6 % або 2 % (залежно від очікуваних продуктів ПЛР) в натрій-боратному буфері (SB) (Brody, Kern, 2004). Для цього зважували необхідну кількість агарози. Вносили агарозу в термостійку банку Simax. Доливали потрібний об'єм буфера. Доводили суміш агарози і буфера до повного розчинення агарози у мікрохвильовій печі. Далі охолоджували банку до 50-60 °C під струменем води, при постійному перемішуванні. В якості барвника використовували етидійбромід в концентрації 0,5 мкг/мл. Закривали плашки гумовими спейсерами та ставили гребінки на необхідну кількість лунок. Заливали плашки, давали агарозі застигнути протягом 30–60 хв під витяжкою. Перед внесенням плашки в камеру витягали гребінки. Вносили плашку з гелем в камеру так, щоб вона була повністю покрита буфером. Обережно в кожен лунку вносили

8 мкл зразка (для продуктів полімеразної ланцюгової реакції) або 5 мкл (для загальної ДНК) плюс 1 мкл 6× буфера для нанесення. Для визначення розміру продуктів використовували 2 види маркерів молекулярної маси: ДНК бактеріофагу λ /HindIII (Thermo Fisher Scientific); (для загальної ДНК та для деяких реакцій, розмір ампліконів, п.н.: 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564, 125) та GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) (для всіх інших реакцій, розмір ампліконів, п.н.: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100). Встановлювали постійну напругу на електродах від 3 до 7 В/см залежно від розмірів очікуваних ампліконів. Сила струму була змінною. Час проведення електрофорезу обирали від 30 хв до 2 год.

Документування результатів горизонтального гелі-електрофорезу проводили наступним чином. Обережно виймали плашку з гелем з камери та переносили гель в пластикову ємність. Далі промивали гель дистильованою водою декілька раз. Для отримання зображення гелів використовували джерело УФ-світла та фотоапарат Canon. Отримане зображення обробляли за допомогою графічного редактора GIMP (Kimball, Mattis, 2020).

2.3.8 Аналіз глютенінової фракції запасних білків пшениці методом електрофорезу у поліакриламідному гелі

Виділення та розділення глютенінової фракції білків зерна пшениці здійснювали згідно (Рибалка та ін., 2007), що передбачає екстрагування глютенінової фракції етанолом з наступним розділенням білкових субодиниць шляхом ДСН ПААГ. Дослідження проводили на базі відділу генетичних основ селекції СГІ – НЦНС НААН України.

2.3.9. Аналіз гліадинової фракції запасних білків пшениці методом електрофорезу у поліакриламідному гелі

Виділення та розділення гліадинової фракції білків зерна пшениці здійснювали згідно (Рибалка та ін., 2007), що передбачає екстрагування гліадинової фракції з наступним розділенням білкових субодиниць шляхом кислого ПААГ у буфері рН 3,1. Екстракцію запасних білків з окремих індивідуальних зернівок проводили 70 % (v/v) етанолом. Дані дослідження були виконані на базі відділу генетичних основ селекції СГІ – НЦНС НААН України.

2.3.10. Метод визначення активності поліфенолоксидаз

Для якісного визначення сумарної активності ферментів поліфенолоксидаз зерна використовували як субстрат 1 % фенол. Зерно пшениці до початку аналізу подрібнювали і робили наважки по 0,1 г шроту. Обробку наважки зерна здійснювали 1 % фенолом (700 мкл) 3 год. Зміна умов досліду здійснювалася для виявлення чіткої кореляції незалежно від умов досліду. Шрот з наважок паралельно аналізували шляхом мультиплексної ПЛР для визначення алельного стану генів *Ppo-A1* та *Ppo-D1*. Відцентрифугували 3 хв при 6000 об/хв. Забарвлений розчин вимірювали за довжини хвилі 405 нм. В якості контролю використовували 1 % фенол. Під час виміру здійснювали промивку кювети спочатку 70 % етанолом, потім дистильованою водою. Через кожні 5 зразків для контролю проводили вимірювання 1 % фенолу.

Визначення активності поліфенолоксидазних ферментів з використанням в якості субстрату L-DOPA здійснювали згідно (Anderson, Morris, 2001; Sun et al., 2005) з власними модифікаціями. Наважку (150 мг) зерна обробляли 10 мМ L-DOPA в 50 мМ MOPS буфері (рН 6,5). Премішували на шейкері Eppendorf Thermomixer comfort 30 хв при

температурі 25 °С. Відцентрифугували 3 хв при 12000 об/хв. Забарвлений розчин вимірювали за довжини хвилі 490 нм. В якості контролю використовували 10 мМ L-DOPA в 50 мМ MOPS буфері (pH 6,5).

2.4. Статистичний аналіз результатів

Отримані дані були оброблені статистично за допомогою програм ANOVA та Excel. Для підтвердження достовірності результатів описані дослідження проводили тричі. Статистичну достовірність відмінностей між отриманими даними оцінювали за допомогою критерію Стюдента. Розраховували найменшу істотну різницю (NIP), $p \leq 0,05$. Перед проведенням дисперсійного аналізу застосовували арксинусне перетворення для даних, виражених у відсотках (Sokal, Rohlf, 1981). Для багатофакторного дисперсійного аналізу (Fisher, 1918) та побудови графіків використовувався інтерпретатор мови програмування R (Ihaka, Gentleman, 1996) версії 3.0.2.

Статистичну обробку отриманих цифрових даних здійснювали стандартними методами (Чумак та ін., 2009), які включали розрахунок середнього значення, дисперсії S^2 і стандартного відхилення S , визначення грубих похибок з використанням 3S критерію, β -критерію та критерію Романівського з наступним розрахунком надійного інтервалу прямого вимірювання в програмному забезпеченні Microsoft Excel. Загальноприйняту методику обробки результатів (Лакин, 1990) застосовували для підрахунку довірчих інтервалів, коли оцінювалася достовірність отриманих результатів, та критерію χ^2 для достовірності оцінки розщеплення у статевих поколіннях трансформантів

РОЗДІЛ 3

ПРИНЦИПИ КОНСТРУЮВАННЯ ВЕКТОРІВ ТА ДОБІР ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ДНК ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

Рослини мають значну адаптивність, яка забезпечується різноманіттям пристосувальних механізмів та генів, з ними пов'язаних. Мохи Антарктики постійно зазнають впливів екстремальних абіотичних стресових чинників, а тому є перспективними для вивчення генів стійкості таких як: small hydrophobic proteins (*SHP*) – кодують малі гідрофобні білки, активуються при впливі більшості стресових чинників – зневоднення, надмірне засолення, знижена температура; dehydration-responsive element (DRE)-binding factor 1 (*DBF1*) – фактори зв'язування елементів відповіді на зневоднення (DRE) – транскрипційні фактори, які регулюють активність генів промоторів відповіді на посуху; nitrate reductase (NIA) activity *Nia* – кодує нітратредуктазу, бере участь в азотному обміні і реакції на надмірну кількість азоту; peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) *PPAR2*, *PPAR9* – беруть участь в підвищенні стійкості до замерзання, підвищення експресії спостерігається також при впливі високих концентрацій NaCl та при наявності абсцизової кислоти; glutamate 5-kinase (*PRO1*) – ген *Saccharomyces cerevisiae* кодує фермент гаммаглутаматкіназу, який каталізує перше перетворення в ланцюзі біосинтезу проліну (пролін характерний тим, що накопичується у клітині у відповідь на велику кількість абіотичних стресових чинників); sucrose phosphate synthase (*SPS*) – ген сахарозофосфатсинтази, ключового ферменту регуляції біосинтезу сахарози (знайдений переважно в однодольних.)

Існує цілий ряд різноманітних універсальних молекулярних механізмів підтримки життєдіяльності клітини в широкому діапазоні умов навколишнього середовища. Серед них важливими є малі гідрофобні білки *SHP* (small hydrophobic proteins), які зв'язуються з білками мембрани клітини,

збільшуючи її міцність, підтримуючи нормальний агрегатний стан та роботу. При цьому зростає неспецифічна стійкість клітини до широкого спектра абіотичних стресових чинників: зниження температури, замерзання, зневоднення, надмірного засолення, дегідратації. Дані гідрофобні білки кодуються групою генів *shp*, залежних від абсцизової кислоти (АБК). Ці гени активуються під дією АБК у відповідь на вплив вищезазначених стресорів і транскрибуються протягом першої, найінтенсивнішої фази протидії (Kroemer, 2004; Strotbek, 2013). Така значна роль у виживанні рослин робить ці гени та білки цікавими і перспективними об'єктами для вивчення та подальшого застосування у генетичній інженерії.

Мохи Антарктики демонструють значну стресостійкість та адаптаційну гнучкість, завдяки еволюційно закріпленим потужним захисним механізмам, несучи, з високою ймовірністю, гомологи генів *shp*, альтернативні послідовності яких являють неабиякий інтерес для надання неспецифічної стійкості до абіотичних несприятливих чинників культурним вищим рослинам. Тому, метою даної роботи було дослідження колекції зразків антарктичних мохів на наявність гомологічних генетичних послідовностей гена малого гідрофобного білка *shp1*.

3.1. Вивчення послідовності гена *SHP1* у мохів Антарктики

В роботі досліджували наступні зразки мохів: *Physcomitrella patens* (модельний об'єкт), *Warnstorfia fontinaliopsis* (СП61), *Warnstorfia fontinaliopsis* (СП62), *Bryum pseudotriquetrum* (зібраний у Антарктиці і розмножений *in vitro*), *Bryum argenteum*, *Polytrichum juniperinum*, *Pohlia nutans*, *Ceratodon purpureus*, *Oxyrrhynchium hians*. Більшість зразків представляють мохи Антарктики, але для порівняння додано зразки, зібрані у Санкт-Петербурзі (Російська Федерація) у 2012 році.

Малі гідрофобні білки – переважно невеликі за розміром (100–150 амінокислотних залишків) поліпептиди. На сьогодні трьохвимірні

структура білків не досліджена. Однак на основі попередніх даних виявлено, що у своєму складі вони містять один або два висококонсервативних гідрофобних трансмембранних домени (рис. 3.1).

	TM1	TM2
At_O82232	---MAS---SCELCCEIITAIILPPVGVCLRFGCCCTVEFFICLLTLGLYIPGIIYATVAICFLHRDEYFDEYRRP (5)	
At (RC24)_Q9SUI0	---MPS---NCEILCEIITAIILPPVGVCFRGGCCCTVEFFICLLTLGLYIPGIIYATVIVFQHREEYFDEYRRP (4)	
At (RC23)_Q9M095	---MAS---NMEVCEIITAIILPPVGVCLRGGCCCTVEFFICLLTLGLYIPGIIYATVIVFQHREGS-TELGA (4)	
At (LTI6B)_AAF26091	---M---STATFVEIITAIILPPVGVFLKGGCK-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVITKNSCFVFLSLWD---	
At (RCI2B)_AAK50618	---M---STATEVEIITAIILPPVGVFLKGGCK-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVITK---	
Os_BAC16385	---MAD---STATCIDIITAIILPPVGVFEKGGCG-DEFWICLLTLGLYIPGIIYATVITK---	
St_BAC23051	---MGD---STMTCDIITAIILPPVGVFLKGGCK-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVITK---	
Os_AAG46140	(6)AMAD---RTATFVDIITAIILPPVGVFLKGGCG-DEFWICLLTLGLYIPGIIYATVIVNH---	
Os_AAM46894	---MA---GTANCIDIITAIILPPVGVFLKGGCG-DEFWICLLTLGLYIPGIIYATVITK---	
At (RCI2A)_AAK50619	---M---STATFVDIITAIILPPVGVFLRGGCG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVITK---	
At_AAM15078	---MGS---ETFEIITAIILPPVGVFLRGGCG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVG---	
At_AY060504	---MGS---ETFEIITAIILPPVGVFLRGGCG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVIL---	
Hv (blt101.1)_Q42509	---MGS---ATVLEVIITAIILPPVGVFLRYKLG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVV---	
Le (ESI3)_AAA21847	---MGS---ATVLEVIITAIILPPVGVFLRYKLG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVV---	
Ta_BAB03288	---MGS---ATVLEVIITAIILPPVGVFLRYKLG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVV---	
Hv (blt101.2)_Q9ARD5	---MAS---ATFIEVIITAIILPPVGVFLRYGLA-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVA---	
Os_AA016991	---MAS---ATFIEVIITAIILPPVGVFLRYGLG-VEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVA---	
Os_Q9LR17	---MASG---RCCTFEIITAIILPPVGVFLRGGCCSMEFFICLLTLGLYIPGIIYATVILVALSDQYQREYHTLA---	
Ath (RC21)_Q9FE70	---MGS---ELEVLCIIFIPPVGVFLRYGLG-DEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILTK---	
Pp (PpSHP2)_AY496072	---MGKGGSTATFCEVITAIILPPVGVFLRYACG-DEFWICLLTLGLYIPGIIYATVIVR---	
Pp (PpSHP1)_AY496071	---MPIGSR---GATFVDIITAIILPPVGVFLRYGLQ-SEFWICLLTLGLYIPGIIYATVILVG---	
Ta_AAN06944	---CRCLEILCAITLPPVGVFLRGGCCSMEFWISVLLTLGLYIPGIIYATVILVICSVDPRVRRRDDY (4)	
Atu_AAK86229	(22)TG-KPIIVDVIRIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILRR---	
Rr_ZP_00016294	---MDIVRIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILVIAKY---	
Pf_ZP_00086832	(5)QPPIRSCPMDFIRIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILVIAKY---	
PpuAAN66004	---MDFIRIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILVIAKY---	
Ps_AA054050	---MDIIRIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILVIAKY---	
Ce_Q22700	---MALTCTDIPKFIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILVIAKY---	
Nc_EAA31469	---MAFTASDICKIITAIILPPVGVFLRYGLG-KQFWINILLTLGLYIPGIIYATVILVIAKY---	

Рис. 3.1. Порівняння послідовностей малих гідрофобних білків у представників різних видів. Жирним шрифтом позначено білки SHP1 та SHP2 моху *Physcomitrella patens*. Виділено два трансмембранних домени, що характерні для представників даного класу.

3'UTR ділянка мРНК бере участь в субклітинній локалізації РНК-транскрипту на рибосомах ендоплазматичного ретикулу (рис. 3.2) (Loya et al., 2008). Таким чином, синтез білків відбувається на рибосомах ендоплазматичного ретикулу.

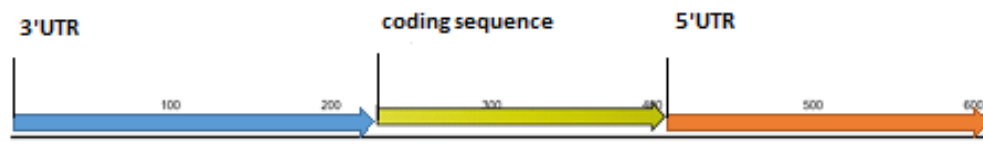


Рис. 3.2. Структура мРНК малого гідрофобного білка *shp1* моху *Physcomitrella patens*.

Малі гідрофобні білки — клас консервативних протеїнів, за припущенням, протеоліпідів, які зустрічаються серед представників найрізноманітніших видів, включаючи рослини, тварини, гриби і бактерії (Кромер et al., 2004). Було показано, що експресія цих білків індукується під

дією таких абіотичних чинників як висока концентрація солей, дегідратація, низькі температури тощо. Однак, на сьогодні роль даних білків у забезпеченні стійкості до негативних чинників середовища є малодослідженою, а конкретні механізми дії залишаються невідомими.

Типовим модельним об'єктом у вищих рослин для біохімічних та молекулярних досліджень є *Arabidopsis thaliana* (різушка Таля). Гомологами SHP білків у *A. thaliana* є група з 8-ми генів AtRCI2. Клонування та дослідження експресії цих генів дозволило припустити, що ізоформи даних білків синтезуються у відповідь на різноманітні абіотичні чинники в різних органах рослини (Medina et al., 2007). Так було показано, що ізоформи AtRCI2A та AtRCI2B акумулюються переважно в стеблах і коренях. На відміну від них AtRCI2D демонструє низький рівень експресії в усіх органах, окрім насіння. В той же час високий рівень експресії транскриптів AtRCI2A, AtRCI2B та AtRCI2C спостерігався в коренях і квітках, і помірний – в листках і зародковій тканині. Більше того, за допомогою флюоресцентної мікроскопії було виявлено, що дані ізоформи мають мембранно-специфічну локалізацію всередині рослинної клітини: білки AtRCI2A–C та AtRCI2E–H локалізувались у плазматичній мембрані, тоді як білок AtRCI2D асоційований з ендоплазматичним ретикулом та апаратом Гольджі. Таким чином, це дозволяє припустити диференціацію функцій залежно від тих чи інших умов середовища.

У дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та *Schyzosaccaromices pombe*, гомологами рослинних білків є малі гідрофобні білки групи РМР (РМР1р, РМР2р, РМР3р). Дані білки виділяються разом з фракцією білка Рта1, що у дріжджів є головним H^+ -АТФазним білком плазматичної мембрани (Loya et al., 2008). Дискусійним залишається зв'язок малих гідрофобних білків з функціонуванням H^+ -АТФазного комплексу (Navarre et al., 1992).

За нормальних умов дані білки не є критичними для виживання організму, однак штами дріжджів з нокаутуваними генами білків РМР

виявляли нижчу виживаність при високих концентраціях солей порівняно з дикими штамми.

Трансформація нокаутованих штамів дріжджів генами родини AtRCI2 арабідопсису показала, що принаймні деякі з них (AtRCI2A, AtRCI2B, AtRCI2C, AtRCI2H) були здатні компенсувати втрату гена PMP3. Таким чином, PMP білки можуть виступати або регуляторними білками, або ж бути частиною H^+ -АТФазного комплексу, і таким чином регулювати надходження іонів Na^+ в клітину та поляризацію мембрани. В той же час, їх роль у забезпеченні стійкості до інших абіотичних стресових чинників (низькі температури, зневоднення) залишається незрозумілою.

Найбільш дослідженим є мох *Physcomitrella patens*, для якого відома повна послідовність геному, і який використовується в якості модельного об'єкта при дослідженні мохів. У мохів представниками родини малих гідрофобних білків є білки SHP1 та SHP2 (100–150 амінокислотних залишків). У модельного моху експресія даних генів індукується під дією сорбітолу, абсцизової кислоти, холоду, дегідратації та високих концентрацій солей. Така перехресна активація під дією різних чинників може бути пояснена порівняно простою будовою мохів. Гени *shp* невеликі (довжиною до кількох сот нуклеотидів), послідовність включає в себе всього один інтрон. Малі гідрофобні білки містять у своєму складі два висококонсервативні гідрофобні домени. Тому припускається, що основна роль SHP у забезпеченні адаптаційних властивостей полягає у стабілізації структури мембрани, що комплексно підвищує стресостійкість рослини.

Для ґрунтового проведення дослідження було здійснено пошук доступних у генетичному банку даних National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank послідовностей цільового гена *shp1*, код доступу NW_001865459 (National Center for Biotechnology Information, GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Як модельний організм було обрано мох *Physcomitrella patens* через його всебічну вивченість та вже здійснене

повне секвенування геному. Зібрано інформацію про кодуючу послідовність гена, наявність інтронів, доменну структуру, його оточення.

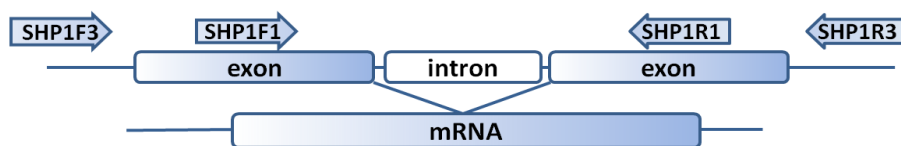


Рис. 3.3. Схематичне зображення гена *shp1* моху *P. patens*. Відмічено екзон-інтронну структуру та стрілками вказано місця розташування праймерів, які використовувалися у дослідженні.

На рис. 3.3 показаний ген *shp1* загальною довжиною близько 350 п.н., інтрон всередині кодуючої послідовності та транскрибовані у мРНК ділянки сумарною довжиною 180 п.н. Також був проведений пошук гена інтересу серед рослин різних таксонів, який показав не лише значне поширення шуканих послідовностей, а й подібність кодуючої частини досліджуваного гена навіть у віддалених видів, наприклад, таких як мох, плаунок, ялина канадська, рис, кукурудза. На рис. 3.4 схематично показано ділянки співпадіння генетичних послідовностей з високою вагою вирівнювання. Ліворуч вказано назви організмів із зазначенням кодів доступу у Генетичному банку, а праворуч – довжину послідовності у нуклеотидах.

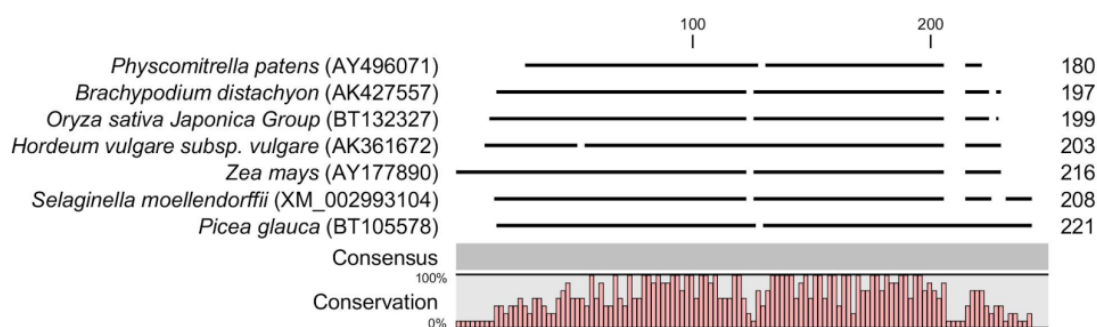


Рис. 3.4. Результати вирівнювання кодуючої послідовності мРНК гена *shp1* моху *P. patens* з найбільш гомологічними послідовностями інших організмів.

Аналіз трансльованої послідовності мРНК гена *shp1* також показує високу консервативність амінокислотного складу відповідного білка навіть у віддалених видів (рис. 3.5). Більшість замін у нуклеотидних послідовностях

незначущі, вони, очевидно, принципово не змінюють амінокислотну послідовність білка.

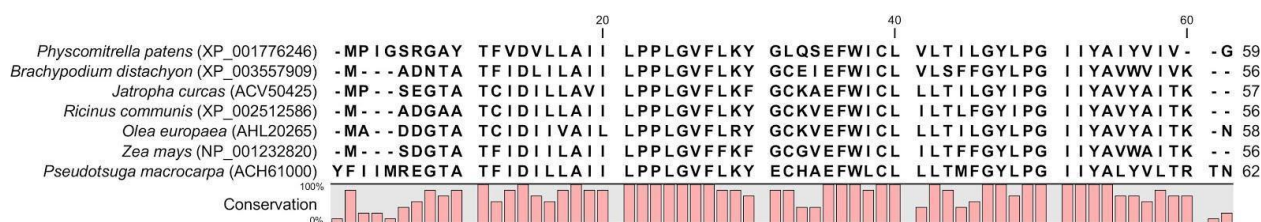


Рис. 3.5. Вирівнювання амінокислотної послідовності білка SHP1 моху *P. patens* з гомологічними послідовностями інших рослин.

Значне поширення гомологічних до гена *shp1* послідовностей та їх консервативність дозволяє припустити, що кодовані ними білки мають схожі функції та еволюційно важливі для рослинного світу.

На основі аналізу структури гена *shp1* моху *P. patens* було підібрано кілька пар праймерів (див. табл. 3.1 та рис. 3.3). Пара SHP1F1–SHP1R1 (відповідно 5'–GGT TCA CGA GGC GCT TAC ACG–3' та 5'–CCC AGG ATT GTC AGC ACG AG–3') підбиралася комплементарною до консервативного домена нуклеотидної послідовності гена, що збільшує ймовірність виявлення саме гена інтересу через його низьку варіабельність у різних видах. Тут очікувана довжина фрагмента становить близько 180 п.н. На противагу, пара праймерів SHP1F3–SHP1R3 (5'–TGT CCA GTG CTC TGC TTG TT–3' та 5'–TCA CTC CGA TGA GGC TAA GGA–3') має місце посадки в околі кодуючої послідовності гена, забезпечуючи покриття обох екзонів та інтрону, і відзначається хорошими термодинамічними характеристиками, що може покращити ампліфікацію фрагмента довжиною 500 п.н.

Праймери для синтезу ДНК та кДНК генів *shp* конструювали за допомогою програми Primer-BLAST (NCBI). Послідовності вибирали таким чином, щоб оптимально зв'язувалися з мРНК в еволюційно консервативних ділянках.

Таблиця 3.1

Характеристика сконструйованих праймерів

Назва і тип праймера	Нуклеотидна послідовність	Інвентарний номер гена у генбанку	Величина амплікону, п.н.
SHP1 прямий праймер (PpSHP1F2)	CCC CGA GCA TTT TGC GAA GA	AY496071.1	224
SHP1 зворотній праймер (PpSHP1R2)	TCA TGG AGG AAG AGG GAC TCA	AY496071.1	224
SHP2 прямий праймер (PpSHP2F2)	AGT TAG GCT TGT GAT CTC ATT TGC	XM_001765440.1	233
SHP2 зворотній праймер (PpSHP2R2)	CAC AAG ACC TCG AGC AGA CC	XM_001765440.1	233

Нами були проаналізовані ДНК-послідовності різних видів антарктичних мохів на наявність гена *shp1* та подібність його структури і послідовності до таких у *P. patens*. Для цього модифікованим ЦТАБ-методом виділялася загальна ДНК мохів (14 зразків). Наважки зеленої маси (50–200 мг) моху гомогенізували в стерильних ступках із кварцевим піском та ЦТАБ-буфером з 2-меркаптоетанолом. Отриману суспензію інкубували при 55 °С та центрифугували для осадження піску та фрагментів клітин рослини. Надосад відділяли та триразово очищували хлороформом від білків. Нуклеїнові кислоти преципітували за допомогою ЦТАБ-осаджуючого розчину впродовж 16-ти годин при кімнатній температурі та відцентрифугували. Проводили ензиматичний гідроліз загальної РНК та фінальну обробку хлороформом для повної екстракції білків та РНКаз. ДНК висолювали з розчину ізопропанолом, відцентрифугували та промивали 70 % етиловим спиртом. Осад загальної ДНК розчиняли у 50 мкл ТЕ буферу рН 8,0 (Somma, 2006).

Далі проводили ПЛР у суміші об'ємом 20 мкл, яка містила по 0,35 мкМ кожного з праймерів, 1×DreamTaq™ Green буфер (Thermo Scientific), 200 мкМ дНТФ, 0,5 одиниці DreamTaq™ полімерази та 30 нг зразку ДНК. Негативним контролем слугувала реакційна суміш з 1 мкл ТЕ буфера рН 8,0 замість зразка ДНК (Saiki et al., 1988; Ausubel et al., 2003). Застосовували пари праймерів: SHP1F1 та SHP1R1; SHP1F3 та SHP1R3. Умови проведення

реакцій були: денатурація матриці ДНК – 94 °С, 30 с; посадка праймерів – 55 °С, 30 с; елонгація ланцюга – 72 °С, 45 с, завершальна елонгація – 72 °С, 10 хв.

Ми припустили, що через значну консервативність шуканий ген буде мати подібну довжину у різних видів мохів, тому результати ПЛР було проаналізовано на наявність ампліконів співставної довжини з відповідним фрагментом у *P. patens* (550 п.н.).

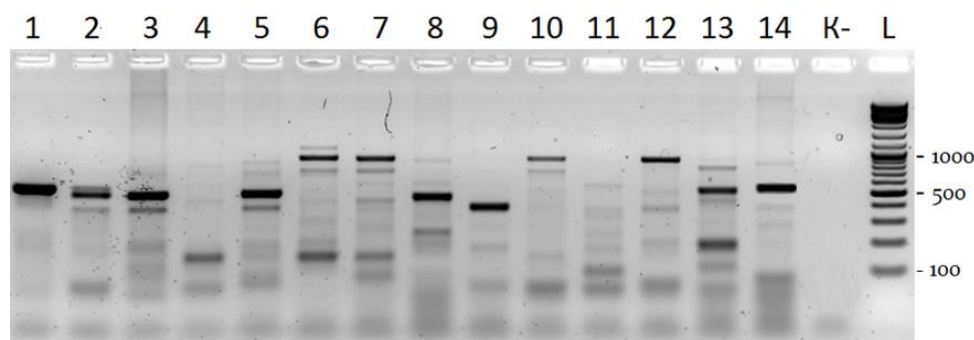


Рис. 3.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *shp1* з праймерами SHP1F3–SHP1R3 на матриці геномної ДНК. Доріжки: 1 – 5/2009 (*W. fontinaliopsis*), 2 – M6, 3 – M26 (*B. pseudotriquetrum*), 4 – P23 (*W. fontinaliopsis*), 5 – 15, 6 – 15/2 (*P. juniperinum*), 7 – 14 (*B. pseudotriquetrum*), 8 – 27 (*P. nutans*), 9 – SPB10, 10 – SPB4, 11 – SPB11, 12 – 20 (*B. pseudotriquetrum*), 13 – 20 (*B. argenteum*), 14 – *P. patens*, K – негативний контроль, L – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Для більшості досліджуваних зразків найчіткіше проявлявся один основний фрагмент (рис. 3.6), але спостерігали й менш інтенсивні сигнали. Найвиразніший амплікон, ймовірно, є цільовим, тобто відповідає гену *shp1*. Мінорні сигнали часто супроводжують головний амплікон, тому можемо припустити наявність послідовностей з незначними відмінностями, алелізм або багатокопійність шуканого гена. У більшості видів довжина цільового фрагмента подібна до відповідної у модельного моху (550 п.н.). У декількох зразків спостерігалась істотна відмінність довжини амплікону (900 п.н.) від модельного об'єкта, але значна подібність цих фрагментів між собою. Таку дивергенцію можна пояснити філогенетичною близькістю видів. Відмінності у розмірі ампліфікованих фрагментів можуть зумовлювати переміщення

сайтів посадки праймерів поблизу гена, або зміни у послідовності гена за довжиною або типом інтронів у ході еволюційного процесу.

При дослідженні кодуючої послідовності гена *shp1* у геномній ДНК *P. patens* виявлено фрагмент довжиною близько 350 п.н., що відповідає очікуваному (рис. 3.7).

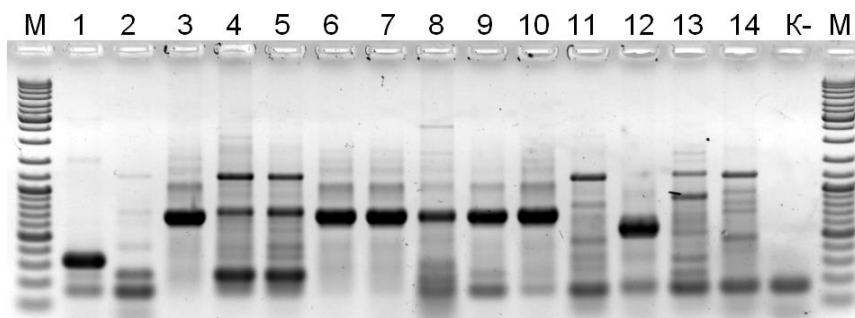


Рис. 3.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами SHP1F1-SHP1R1 на матриці геномної ДНК. Доріжки: 1 – *P. patens* (референт), 1–13 – досліджувані зразки, К- – негативний контроль, М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

При використанні праймерів SHP1F1-SHP1R1 кількість ампліконів у досліджуваних зразків зменшилась. При цьому спостерігалась значна подібність ампліконів за довжиною, на відмінну від попередньої пари праймерів. Це можна пояснити консервативністю сайту посадки даної пари праймерів і, відповідно, більшою специфічністю проходження ампліфікації. Можна провести умовне групування отриманих цільових ампліконів за довжиною. У більшості досліджуваних зразків довжина отриманого домінуючого амплікону становила близько 700 п.н., а саме зразки № 2, 5–9; зразки № 3–4, 10–11, 13 мають амплікони довжиною близько 700 п.н. та 1100 п.н., а зразки № 1 та 12 не мають таких фрагментів.

Найбільшу відповідність сигналів ПЛР до референту показав мох *Warnstorfia fontinaliopsis*, що дозволяє стверджувати про наявність та високу гомологічність гена *shp1* в його геномі. Такий висновок також підтверджується стійкістю цього виду до різноманітних стресових чинників (Backert et al., 1997), а тому саме він був залучений до наступної стадії роботи – отримання кДНК цільового гена та його подальшого дослідження.

Наступним кроком дослідження була перевірка активності гена *shp1*, а саме його транскрибування. Для цього виділяли загальну РНК мохів. Рослинний матеріал (100–200 мг) гомогенізували у буфері для виділення загальної РНК (1 М Tris, 0,5 М EDTA, 5 М NaCl, 10 % SDS) та 2-меркаптоетанолом. Для очищення гомогенату від білків та фрагментів клітин використовували суміш кислого фенолу та хлороформу (1:1) і відцентрифугували. Відбирали водну фазу, додавали ізопропанол та 3 М натрій ацетат. НК преципітували при -70°C та відцентрифугували. Осад промивали 70 % етанолом для видалення SDS, EDTA та інших небажаних компонентів, розчиняли в DEPC-MilliQ. Зберігали при -70°C (Box et al., 2011). Проводили гідроліз залишкової ДНК з використанням ферменту ДНКазі I та RiboLock RNase inhibitor протягом 30 хв при 37°C у відповідності до рекомендацій компанії виробника Thermo Scientific. Реакцію зупиняли додаванням 50 мМ EDTA та денатурацією ДНКазі I при 65°C .

Для здійснення зворотної транскрипції матричної РНК у реакційну суміш для синтезу першого ланцюга кДНК на матриці мРНК додавали праймери Oligo(dT)₁₈, dNTP Mix, RiboLock RNase inhibitor та зворотну транскриптазу RevertAid згідно рекомендацій виробника Thermo Scientific. Реакцію проводили 1 год за температури 42°C та зупиняли денатурацією ревертази за 70°C .

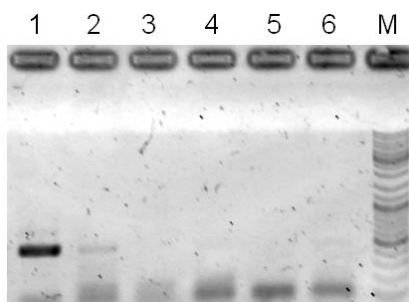


Рис. 3.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК з праймерами SHP1F3–SHP1R3 на матриці кДНК. Доріжки: 1 – *P. patens* (референт), 2–5 – досліджувані зразки, 6 – негативний контроль, М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Візуалізація продуктів ПЛР показала повну відсутність ампліконів на матриці кДНК (рис. 3.8). Такі результати можуть зумовлюватися видаленням

або значною зміною ділянок посадки праймерів при транскрипції чи процесингу РНК.

Через неможливість виявлення на кДНК послідовності гена *shp1* парою праймерів SHP1F3–SHP1R3 в дослідження була залучена пара праймерів SHP1F1–SHP1R1, місце посадки якої знаходиться у консервативному домені гена, що дозволить більш точно та однозначно виявити шукану кодуючу послідовність. Серед перевірених зразків на матриці отриманої кДНК було проведено ПЛР із ген-специфічними праймерами SHP1F1–SHP1R1. Умови проведення реакції були наступними: денатурація матриці ДНК – 94 °С, 30 с; посадка праймерів – 55 °С, 30 с; елонгація ланцюга – 72 °С, 45 с. Виявлено, що ампліфікація відбувається не на усіх зразках, а лише на *Physcomitrella patens* та *Warnstorfia fontinaliopsis*. Були отримані фрагменти очікуваної довжини 180 п.н. (рис. 3.9), що підтверджується також біоінформатичним аналізом. Це може свідчити про експресію в цих видів гена *shp1* та його високу гомологічність у геномі.

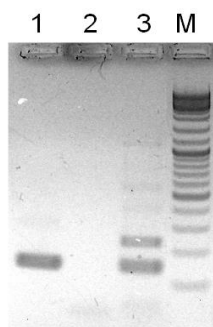


Рис. 3.9. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *shp1* з праймерами SHP1F1–SHP1R1 на матриці кДНК. Доріжка 1 – *P. patens* (референт), 2 – порожня, 3 – кДНК моху *W. fontinaliopsis*, М – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Крім того, у *W. fontinaliopsis* було виявлено додатковий амплікон подібної довжини (220 п.н.) та інтенсивності, через що він також представляє інтерес як можливий гомолог чи ізоформа гена. Такий висновок підтверджується спостереженням значної стійкості цього виду до різноманітних стресових чинників. Те, що праймери спрацювали для

W. fontinaliopsis, і амплікон має подібну довжину, вказує на високий ступінь гомологічності нуклеотидної послідовності.

Отримані фрагменти були залучені до наступної стадії роботи – 1) препаративної ПЛР з Pfu-полімеразою, яка забезпечує меншу кількість помилок при синтезі ДНК та дає тупі кінці амплікону, що зручно при лігуванні з вектором pUC19; 2) виділення бажаного фрагмента ДНК з препаративного гелю (рис. 3.10) і його очищення від агарози.

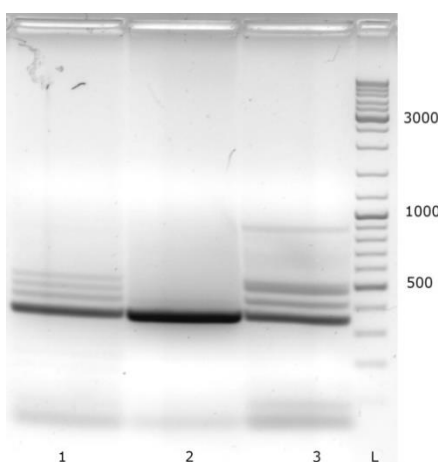


Рис. 3.10. Електрофореграма препаративного електрофорезу продуктів препаративної ПЛР кДНК *shp1*. Доріжка 1 – *P. patens*, 2 – *W. fluitans* (зразок 5_2009), 3 – *B. pseudotriquetrum* (зразок М6).

Для виділення та очищення амплікону з гелю використовували набір Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. K0513) згідно настанов виробника. Вирізали необхідну смужку з гелю під УФ світлом (360 нм), переносили в 1,5 мл пробірку, зважували, додавали необхідний об'єм розчину I (3 об'єми : 1 маси). Витримували при 50 °С, перемішуючи, поки вся агароза розплавиться, причому колір розчину має бути жовтим (якщо колір був червоний – додавали (1–5 мкл) 3 М NaOAc, рН 5,0). Додавали об'єм розчину II, рівний об'єму гелю та 5 мкл суспензії SiO₂, витримували 5 хв при 55 °С, центрифугували 1 хв при 12000 об/хв та зливали супернатант. Далі промивали 500 мкл холодного розчину III, ресуспендували осад SiO₂, проводили центрифугування 5 с при 12000 об/хв та зливали надосад. Промивання повторювали 3 рази, ретельно відібравши

залишки розчину III, який містив етанол. Для елюції додавали 50 мкл TE буферу, ресуспендували осад ДНК-SiO₂, інкубували 5 хв при 55 °С, центрифугували 5 с при 12000 об/хв, надосад переносили у нову пробірку.

Після виділення амплікону проводили його лігування з попередньо розлінієним по сайту SmaI у полілінкері вектором pUC19 (рис. 3.11). Даний вектор був обраний через його багатокопійність, універсальність, невелику довжину (усього 2686 п.н.), наявність декількох близькорозміщених унікальних сайтів рестрикції (полілінкер) та зручний селективний ген стійкості до антибіотика ампіциліну.

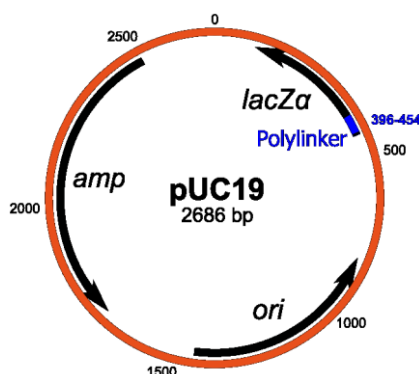


Рис. 3.11. Схематичне зображення вектора для клонування pUC19. Позначено: *ori* – рМВ 1 реплікон початку реплікації; *amp* – ген *bla*, що кодує бета-лактамазу і забезпечує стійкість до ампіциліну; *lacZα* – фрагмент *lac* оперону *E. coli*, що містить сайт CAP, промотор P_{lac}, сайт зв'язування *lac* репресора, і 5'-кінцеву частину гена *lacZ*, який кодує N-кінцевий фрагмент бета-галактозидази, зручний для виявлення рекомбінантних плазмід; Polylinker – ділянка, котра містить унікальні сайти рестрикції.

Отриманою векторною конструкцією здійснювали трансформацію *E. coli* хімічним методом, включаючи тепловий шок. Проводився скринінг отриманих можливих трансформантів на селективному середовищі з ампіциліном та X-Gal + IPTG. Відбирали колонії білого кольору (рис. 3.12) у кількості 20-40 штук для кожного отриманого фрагмента, який залучався до лігування.

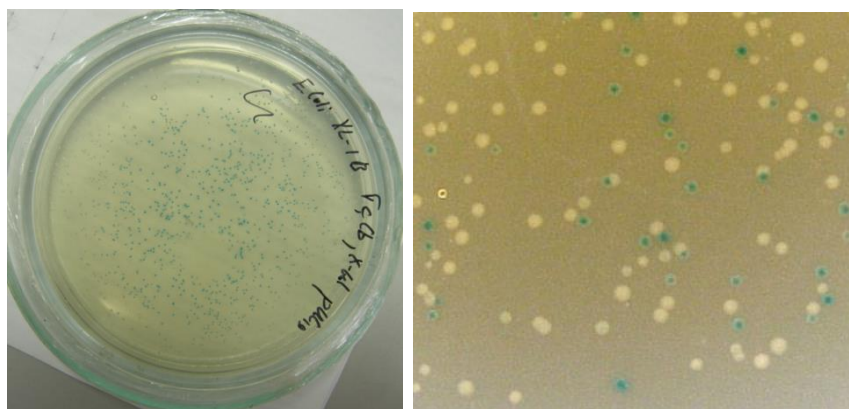


Рис. 3.12. Відбір трансформованих клітин на селективному середовищі з ампіциліном, барвником X-GAL та IPTG.

Реагент X-gal являє собою органічну сполуку, що складається з галактози, з'єднаної з індолом. Вона розщеплюється ферментом β -галактозидазою, утворюючи нерозчинний забарвлений синій продукт. В клітинах кишкової палички *Escherichia coli* штаму XL-1 Blue, який використовувався у роботі, фермент β -галактозидаза кодується геном *lacZ* і синтезується під дією індуктора IPTG. Синій нерозчинний продукт розпаду не утворюється у клонів, що містять рекомбінантну генно-інженерну конструкцію з порушенням, в результаті генетичної вставки, геном *lacZ*.

Кожен клон (колонія білого кольору) нарощувався в 5 мл рідкого живильного середовища, проводилося виділення плазмідної ДНК, рестрикційний аналіз ендонуклеазами EcoRI та HindIII, які вирізали вставку. Перевірка та визначення довжин вставок у різних клонів здійснювалася відносно маркера молекулярної маси Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix (рис. 3.13). Неспецифічні продукти відбраковували.

На основі результатів рестрикції відбирали клони, які містили плазмиду зі вставкою, відповідною гену інтересу. Такі клони готували до секвенування. Для отримання препаративних кількостей плазмідної ДНК нарощувалась бактеріальна культура у 100 мл рідкого середовища при 37 °C, 200 об/хв протягом ночі.

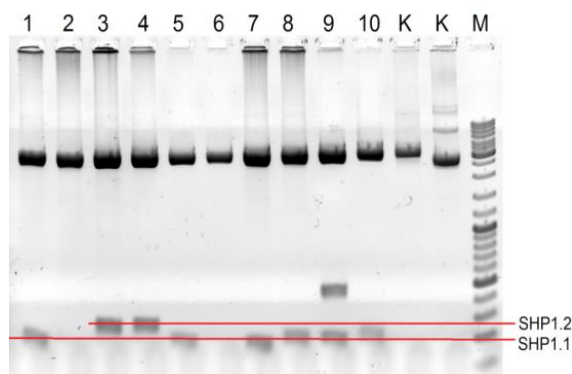


Рис. 3.13. Типова електрофореграма продуктів гідролізу рестриктазами EcoRI та HindIII для скринінгу клонів з рекомбінантними плазмідами.

Суспензію осаджували центрифугуванням 5 хв при 5000 об/хв за 4 °С. Живильне середовище зливали, а осад клітин ресуспендували у 250 мкл розчину I (50 мМ глюкоза, 25 мМ Tris-Cl, pH 8,0, 10 мМ EDTA), потім додавали 250 мкл розчину II (0,2 N NaOH, 1 % SDS), швидко, але акуратно перемішували до набуття суспензією прозорості. Відразу ж додавали 350 мкл холодного розчину III (3 М калій, 5 М ацетат) і перемішували до утворення білого осаду. Осад центрифугували при 12000 об/хв 10 хв. Супернатант переносили у пробірку з 800 мкл ізопропанолу та витримували при кімнатній температурі 10 хв, центрифугували при 12000 об/хв 10 хв. Отриманий осад ополіскували 70 % етанолом, підсушували та розчиняли у 100 мкл ТЕ буферу.

Для сиквенування плазмідної ДНК використовували праймери M13For і M13Rev, специфічні до плазміди в околі полілінкеру, захоплюючи його і вставку, інтегровану в плазмиду.

Було опрацьовано чотири клони (рис. 3.14). Клони A2.6 та A2.13, відповідали ділянці кДНК гена *shp1* моху *W. fontinaliopsis*, тоді як сигнали для клону A2.1 змазані, недостовірні. При вирівнюванні на геном моху *P. patens* виявлено, що досліджувана ділянка відповідає консервативному домену білка Pmp3 дріжджів, який, як припускається, бере участь у транспортуванні іонів крізь мембрану. Аналіз показав наявність

4 нуклеотидних замін, з яких одна є значимою (заміна серину на аргінін) (рис. 3.15 та рис. 3.16).

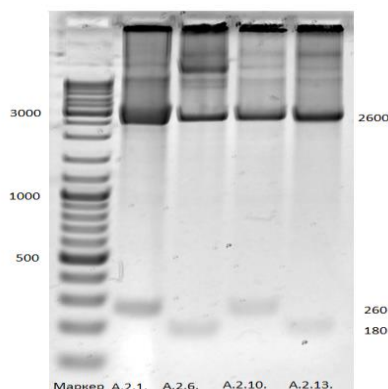


Рис. 3.14. Електрофореграма відібраних для секвенування клонів після рестрикційного аналізу. A2.1, A.2.10 – *shp2* *W. fontinaliopsis*, A2.6, A.13 – *shp1* *W. fontinaliopsis*.

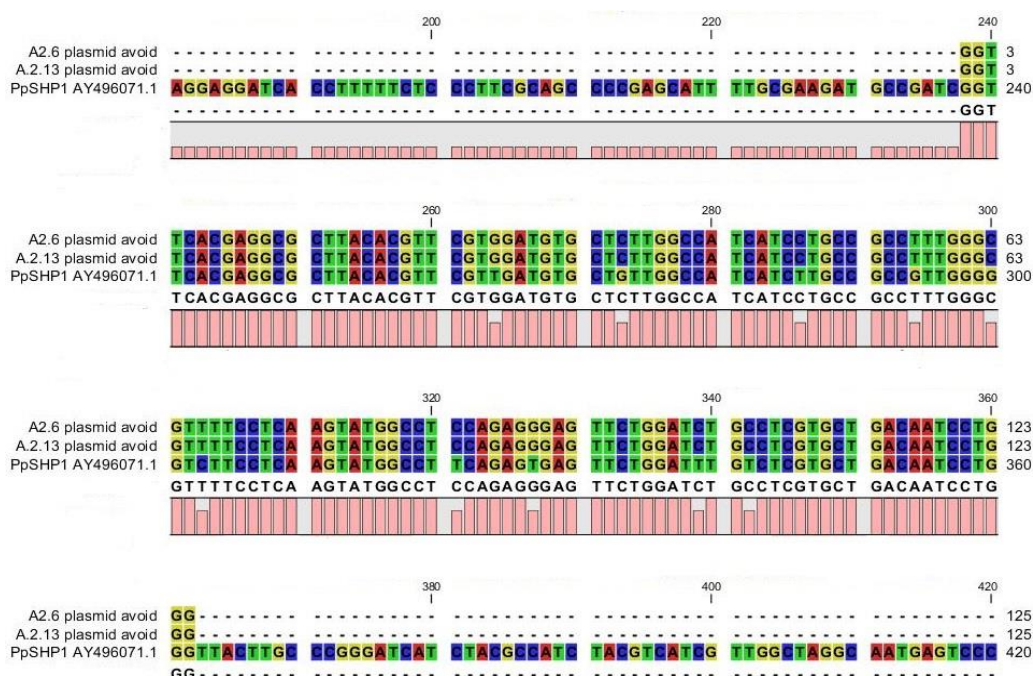


Рис. 3.15. Вирівнювання секвенованих нуклеотидних послідовностей кДНК зразків A2.6 та A2.13 гена *shp1* моху *W. fontinaliopsis* на референтну послідовність *P. patens*.

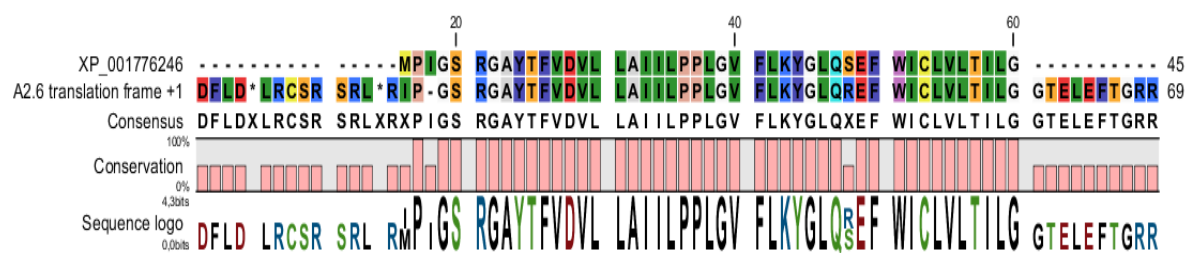


Рис. 3.16. Вирівнювання гіпотетичної послідовності частини білка SHP1 *Warnstorfia fontinaliopsis* на референсну послідовність *Physcomitrella patens* (XP_001776246).

У нашій робочій моделі ми припускаємо, що дана заміна відіграє ключову роль у функціонуванні білка SHP1 в якості фактора захисту рослини від абіотичних чинників у моху *W. fontinaliopsis*, і є його відмінною характерною рисою. Клон A2.10 відповідав кДНК гена *shp2* моху *W. fontinaliopsis*. При вирівнюванні на референтну послідовність *P. patens* для клону A2.10 була показана наявність дев'яти нуклеотидних замін, однак жодна з них не є значимою і не призводить до змін у білковій послідовності.

Отже, узагальнюючи проведену роботу слід зазначити, що перевірка відомих біоінформатичних даних вказує на наявність гомологічних до моху *Physcomitrella patens* послідовностей у інших видів рослин. Підібрані нами праймери дозволили ампліфікувати послідовність гена *shp* моху *Warnstorfia fontinaliopsis*. Кодуюча послідовність була клонована і секвенована. Її порівняння з модельним видом *P. patens* виявило одну значиму заміну в амінокислотній послідовності малого гідрофобного білка SHP1.

3.2. Клонування і молекулярно-генетична характеристика послідовностей ДНК мітохондрій *Deschampsia antarctica*

Вищі квіткові рослини Антарктики представлені лише двома видами *Deschampsia antarctica*, род. *Poaceae* (Злакові) і *Colobanthus quitensis*, род. *Caryophyllaceae* (Гвоздичні). Науковий інтерес до цих рослин зумовлений насамперед їхніми адаптаційними можливостями до важких кліматичних умов Антарктичного материка (низькі температури, різкі коливання температури протягом доби, інтенсивна сонячна радіація та інші стресові абіогенні чинники). Пошук по базах даних Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) показав, що на сьогодні відомо 228 нуклеотидних послідовностей *Deschampsia antarctica* (щучника антарктичного, з них – жодної послідовності мтДНК), лише 86 білків, 4 посилання на маркери та картування геному. У базі біомедичної літератури наявні тільки 33 публікації про *D. antarctica*. З цього витікає, що наразі

відомостей про унікальний знак зібрано недостатньо. Тому надзвичайно важливим є вивчення організації його геному, декодування послідовностей, їх порівняльний аналіз (Ishchenko et al., 2018).

Метою роботи було виділення та аналіз мітохондріальної ДНК представника антарктичної флори *Deschampsia antarctica*. Відповідно формулювалися наступні задачі: виділити мітохондріальну ДНК *D. antarctica*; провести клонування та відбір вставок; сиквенувати отримані фрагменти; провести біоінформатичний аналіз отриманих послідовностей.

Загальна частка мтДНК вищих рослин становить менше 1 % від сумарної ДНК, хоча у виняткових випадках (наприклад у клітинах гіпокотилу дині) може сягати 15 % (Leaver et al., 1982). Особливість організації мтДНК рослин полягає в тому, що геном представлений не однією кільцевою молекулою, як це характерно, наприклад, для геному хребетних тварин. Натомість геном мітохондрій рослин складається з великої кількості гетерогенних фрагментів меншого розміру. Найчастіше вони представлені кільцевими молекулами, рідше – лінійними, катеюнованими або розеткоподібними. Припускається, що такі структури можуть утворювати мембраноасоційовані комплекси, подібні до структури Holiday у дріжджів (Backert et al., 1997).

Більша частина геномних послідовностей мтДНК – мінлива, є некодуючою і унікальна для кожного виду. Інша частина – консервативні, або основні послідовності, що містять набір мітохондріальних генів. Всі знайдені у мітохондрій рослин гени можна поділити на гени рибосомальних РНК та білків, гени тРНК, гени субодиниць дихального ланцюга та псевдогени. Окрім того, існує досить велика частка послідовностей, що містять відкриту рамку зчитування, проте функціональне значення таких генів невідоме. Так, наприклад, мтДНК покритонасінної рослини *Arabidopsis* містить 57 генів, для 49 % яких функція не встановлена.

Об'єктом дослідження у даній роботі були представники антарктичної флори: щучник антарктичний *Deschampsia antarctica* родини Злакові

(*Poaceae*), а також ряд представників класу мохів: *Physcomitrella patens*, *Warnstorfia fontinaliopsis*, *Bryum pseudotriquetrum*, *Bryum argenteum*, *Pohlia nutans*, *Polytrichum juniperinum*. Зразки рослин були отримані у 15-тій антарктичній експедиції на українській дослідній станції «Академік Вернадський», яка розташована на мисі Марина острова Галіндез за 7 км від західного узбережжя Антарктичного півострова. Рослини було введено в стерильну культуру шляхом поверхневої стерилізації та культивовано протягом тривалого часу *in vitro* (Матвеева и др., 2010).

Для виділення плазмідної ДНК брали розчин I для ресуспендування (25 mM Трис-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA), розчин II для лізису (0,2 N NaOH, 1 % SDS) та розчин III для нейтралізації (3 M ацетат калію, 5 M оцтова кислота).

Для виділення мітохондрій застосовували буфер I (0,05 M Трис, 0,33 M сорбіт, 0,025 M EDTA, 1–2 % меркаптоетанол), буфер II (0,05 M Трис, 0,025 M EDTA, 0,5 % меркаптоетанол, 1,25 M NaCl), буфер III (52 % сахароза, 0,05 M Трис, 0,025 M EDTA, 0,5 % меркаптоетанол), буфер IV (30 % сахароза, 0,05 M Трис, 0,025 M EDTA, 0,5 % меркаптоетанол). Для лігазної реакції 10× буфер T4 ДНК лігази містив 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7,8 за 25 °C.

Виділення мітохондрій проводили у ступінчастому градієнті щільності сахарози, (52 % і 30 % відповідно). Рослинний матеріал 10 г свіжих листків *D. antarctica*, розтирали в ступці з буфером I у співвідношенні 1:3, після чого центрифугували 15 хв, 1 000 ×g. Надосад зливали. Осад ресуспендували невеликим пензликом в 10 мл буфера I. В 40 мл пробірку на дно наливали 18 мл розчину III. На розчин III обережно нашаровували піпеткою 7,5 мл розчину IV. На розчин IV обережно наносили 10 мл розчину з мітохондріями. Центрифугували 45 хв при 10000 ×g. Після центрифугування фракція мітохондрій розміщувалась на межі 52 % і 30 % сахарозних буферів. Верхній шар сахарози обережно зливали, після цього відбирали піпеткою 5 мл

мітохондріальної фракції. Переносили в 40 мл пробірку і додавали 30 мл буфера II. Осад ресуспендували пензликком і перемішували (на льоду).

Для виділення мітохондріальної ДНК отримані мітохондрії центрифугували 10 хв при 6000 $\times g$. Супернатант зливали. Ще раз промивали розчином II. Знову центрифугували 10 хв при 6000 $\times g$. Надосад зливали. Пробірку перевертали і ставили на 2–3 хв на фільтрувальний папір. Ресуспендували осад в 0,8 мл розину 0,05 М Трис і 0,025 М ЕДТА, після цього додавали 90 мкл 10 % ДСН. Пробірку ставили на водяну баню на 20 хв при 60–65 °С. Пробірки виймали і охолоджували до кімнатної температури. Додавали 0,6 мл суміші фенол:хлороформ (1:1) і перемішували 5 хв. Центрифугували 10 хв при 6000 $\times g$. Супернатант відбирали і переносили в нову пробірку. Додавали 0,5 мл суміші хлороформ:ізопропіловий спирт (24:1). Знову центрифугували 10 хв при 6000 $\times g$. Супернатант відбирали і переносили в нову пробірку. Додавали ацетат натрію з кінцевою концентрацією 2 М і 0,6 об'єму ізопропанолу. Ставили на 20 хв при –20 °С. Центрифугували 10 хв при 6000 $\times g$, промивали 70 % розчином етанолу. Осаджену ДНК висушували і розчиняли в 30 мкл ТЕ буфері рН 8,0.

Процедура виділення РНК подібна до аналогічних методів отримання ДНК, однак на кінцевих стадіях використовували розчини з кислотним значенням рН для специфічного осадження РНК. Матеріал, отриманий з культур клітин, гомогенізували у буфері для виділення (0,1 М Трис, 5 мМ ЕДТА, 0,1 NaCl, 0,5 % SDS, 1 % 2-меркаптоетанол, рН 8,0). Після чого гомогенат переносили у мікропробірки і очищали за допомогою фенол-хлороформової суміші (1:1) (300 мкл в кожную пробірку), перемішували на вортексі і осаджували центрифугуванням при 6000 $\times g$ 10 хвилин. З пробірок відбирали супернатант, що містив суміші нуклеїнових кислот, і переносили у чисті пробірки. В кожную пробірку додавали 230 мкл ізопропанолу та 30 мкл 3 М ацетату натрію (кінцеве значення рН становило 5,2). РНК осаджували з розчинів центрифугуванням при 6000 $\times g$ протягом 10 хв. Після цього отриманий осад промивали двічі 70 % розчином етанолу центрифугуванням

за тих самих умов. Після висушування, РНК розчиняли у 100 мкл 20 мМ ТЕ буфера. Вихід РНК становив від 40 до 100 мкг на 100 мг тканини.

У даній роботі для отримання комплементарної ДНК (кДНК) спершу проводили зворотну транскрипцію пулу матричної РНК, виділеної з рослинного матеріалу, а потім ПЛР на основі ген-специфічних праймерів. Для реакції зворотної транскрипції використовували специфічний до сайту поліаденілювання РНК праймер Oligo(dT)₁₈. Для блокування дії небажаних РНКаз, в реакційну суміш додавали інгібітор RiboLock. Складові реакції та їх частка зазначені у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Компоненти реакції зворотної транскрипції

Реагент	1 реакція	9 реакцій	4 реакції
DEPC-mQ вода, мкл	5,5	49,5	22
5× реакційний буфер, мкл	4,0	36,0	16
100 мкМ Oligo(dT) ₁₈ (0,5 мкг/мкл) праймер, мкл	1,0	9,0	4
10 мМ дНТФ мікс, мкл	2,0	18,0	8
РНК (реакційна суміш ДНКазної обробки) (~600 нг), мкл	5,0	5,0	5
RiboLock RNase inhibitor, 40 мкг/мкл, мкл	0,5	4,5	2
20 мкг/мкл зворотна транскриптаза, мкл	2,0	10,0	-

Для ПЛР використовували Taq ДНК полімераза торгової марки DreamTaq™. Умови проведення реакції ампліфікації зазначені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Компоненти та програма ПЛР з кДНК

№	Компонент суміші	V=20 мкл	15 реакцій	DBFNIA
1	Milli-Q вода	13,6	204	CNTR BLOCK
2	10× DreamTaq Green буфер	2,0	30	LID=105°C
3	10 мкМ праймер прямий	0,65	9,75	NOWAIT AUTO
	10 мкМ праймер зворотній	0,65	9,75	94°C 04:00
4	2 мМ dNTP	2,0	30	94°C 00:30
5	5 од/мкл DreamTaq полімераза	0,1	1,5	54°C 00:45
6	Загальна ДНК	1,0	-	72°C 00:15
	Разом	20,0	285	GOTO 2 REP 34
				72°C 10:00
				HOLD 22°C ENTER
				END

Для якісного і кількісного контролю зразків ДНК в реакційній суміші на кожному етапі роботи з ДНК використовували електрофоретичне розділення ДНК в агарозному гелі. В переважній більшості експериментів використовували наступні умови: 1 % агарозний гель, 1-кратний SB буфер (10 мМ тетраборат натрію), напруга в електрофоретичній камері становила 3–5 В/см.

Фрагменти кДНК розділяли в 1 % агарозному гелі в 1-кратному TAE буфері (40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ ЕДТА рН 8,0) при напрузі 3 В/см. ДНК виділяли і очищували, використовуючи Silica Bead DNA Gel Extraction Kit™ (Thermo Scientific) згідно рекомендацій виробника. Метод базується на здатності ДНК зв'язуватись з мікрочастинками діоксиду силіцію. Ділянку гелю, що містила ДНК, вирізали скальпелем і поміщали в чисту мікропробірку. Після чого матеріал зважували і до вмісту пробірки додавали зв'язуючий буфер (Binding Buffer) у співвідношенні маса зразка гелю до об'єму буферу як 1:3. Далі суміш інкубували протягом 5 хв при температурі 55 °С до повного розчинення гелю (за необхідності час інкубації можна збільшити). Для зв'язування ДНК до розчину додають суспензію діоксиду силіцію (Silica Powder Suspension). Кремнезем додається у кількості 2 мкл на кожен мкг ДНК (якщо кількість ДНК менша за 2,5 мкл – додається 5 мкл оксиду кремнію). Суспензія інкубується з розчином ДНК протягом 5 хв за температури 55 °С, час від часу пробірки слід перемішувати на вортексі. Після інкубації до пробірки додається 500 мкл промиваючого буферу (Washing Buffer). Розчин ресуспендується, після чого зливають супернатант. Промивання буфером повторюють тричі. Залишки рідини відбирають за допомогою піпетки або висушують за температури 55 °С. Після підсушування виділену ДНК розчиняють в ТЕ буфері. За стандартної процедури виділення, вдається отримати близько 80 % від початкової маси ДНК в гелі.

Для клонування отриманих фрагментів ДНК в якості вектора використовували плазмиду pUC19 (GenBank accession L09137.2) (Vieira et al., 1982; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/L09137>). Він є одним із серії плазмідних векторів клонування, що був створений Мессінгом і його співробітниками у Каліфорнійському університеті, та являє собою кільцеву дволанцюгову ДНК, містить 2686 пар нуклеотидів (рис. 3.11). pUC19 є одним з найбільш широко використовуваних векторів в якості рекомбінантних. Зразки можна легко відрізнити від не-рекомбінантів на основі відмінності за кольором колоній на поживному середовищі, яке містить барвник X-Gal (бромо-хлоро-індол-галактопіраноза). Чужорідна ДНК вбудовується лише у спеціально відведене місце на векторі у сайті клонування (MCS – Multiple Cloning Site).

Для проведення реакції лігування вектор pUC19 та мтДНК попередньо піддавали обробці ендонуклеазою HindIII (для переведення в лінійну форму) та лужною фосфатазою (для вилучення 5'-фосфатних груп). Реакційна суміш об'ємом 100 мкл містила: рестриктаза HindIII – 2,5 мкл (10 од/мкл); лужна фосфатаза – 5 мкл (1 од/мкл); 10× буфер R – 10 мкл (1х – 10 мМ Трис-НCl pH 8,5), 10 мМ MgCl₂, 100 мМ KCl); 0,1 мг/мл BSA; вектор pUC19 – 5 мкг (400 нг/мкл); деіонізована вода Milli-Q (Merck-Millipore) – 77,5 мкл.

Пробірку з сумішшю переносили в термостат та інкубували при 37 °C протягом 1,5 год. Після інкубації проводилась інактивація лужної фосфатази 20 хв при 75 °C. Отриманий зразок, що містив ДНК плазмиди pUC 19, наносили на 0,8 % агарозний гель і здійснювали електрофорез у 1х TAE до отримання чітко розділених продуктів.

Для лігування було використано три реакційні суміші (кожна об'ємом 20 мкл), що містили різну кількість вставки мтДНК: pUC19/HindIII – 6 мкл для кожної проби; вставка хлДНК – 0, 2, 8 мкл відповідно для кожної проби; T4 ДНК лігаза – 1 мкл для кожної проби; 10х T4 ДНК буфер (400 мМ Трис-НCl, 100 мМ MgCl₂, 100 мМ DTT, 5 мМ АТР (pH 7,8 при 25 °C) – 2 мкл для

кожної проби; деіонізована вода Milli-Q (Millipore) – 11, 9, 3 мкл відповідно для кожної проби.

Компоненти реакції не додавались всі одразу: спочатку змішувалась вода, мтДНК та плазмідна ДНК, суміш нагрівали до 45 °С, для руйнування зв'язків, що могли утворитись між липкими кінцями, а вже після охолодження до 0 °С до суміші додавали Т4 ДНК лігазу і 10х Т4 ДНК буфер. Після проведення вищезазначених етапів, лігазну суміш інкубували 16 год при 15–22 °С.

Клітини *E. coli* штаму XL-1 Blue культивували на твердому середовищі АП (450 мл амілопектину, 550 мл дистильованої води, 10 г NaCl, та 15 г агару, рН 7,0, в перерахунку на 1 літр) протягом доби при температурі 37 °С на шейкері при помірному перемішуванні. Стерильність культури підтримували за допомогою антибіотиків тетрацикліну та карбініциліну. Для відбирання колоній зі вставками фрагментів мтДНК до середовища додавали X-gal та IPTG, що дозволяло візуально виявити трансформовані клітини. Включення даних реагентів індукує транскрипцію *lac*-оперона у нетрансформованих клітин. Одним з продуктів оперона є фермент β -галактозидаза. β -галактозидаза розщеплює X-gal, при цьому утворюється галактоза і 5-бромо-4-хлоро-3-гідроксиіндол. Останній окиснюється до 5,5'-дибромо-4,4'-дихлоро-індиго – нерозчинного забарвленого продукту. Таким чином нетрансформовані колонії забарвлювались у блакитний колір. Клітини, що містили рекомбінантні плазміди, були білого кольору, оскільки в них була відсутня активна β -галактозидаза.

Підготовлені компетентні клітини *E. coli* трансформували методом електропорації. Одиначна колонія *E. coli* XL-1 Blue інокулювалася в 10 мл селективного середовища АП, що містило тетрациклін. Культура вирощувалась протягом ночі при 37 °С на шейкері 300 об/хв. На наступний день 1 мл нічної культури переносили в 100 мл середовища і вирощували при температурі 37 °С протягом 2,5 год до досягнення логарифмічної фази росту. Клітини *E. coli* осаджувались у двох 50 мл пробірках при 3500 $\times g$ за 4 °С,

супернатант зливали, після чого осад ресуспендували в 50 мл 10 % охолодженого гліцеролу. Пробірки знову центрифугували і ресуспендували за тих самих умов. На останньому етапі клітини ресуспендували в 200 мкл 10 % охолодженого гліцерилу, після чого отриманий об'єм переносили в мікроцентрифужні пробірки. Пробірки з компетентними клітинами заморожували у рідкому азоті і зберігали при -70°C .

Трансформація клітин *E. coli* проводилася наступним чином. Підготували чотири зразки клітин, по 50 мкл, в мікропробірках. На льоду змішували даний об'єм клітинної суспензії з 1 мкл вектора (50 нг ДНК) і тримали 1 хв на льоду. Перед змішуванням, вектор бажано очистити від реактивів лігазної суміші, тому його переосаджували хлороформом в об'ємах 1:1, додавали 0,1 об'єму 3 М NaAc (рН 5,2) і 2 об'єми спирту. Тримали 10 хв при -20°C , після чого осаджували 15 хв за 15000 об/хв при 4°C . Супернатант відбирався і вектор промивався 70 % спиртом, осаджувався центрифугуванням і розчинявся в 5 мкл деіонізованої води Milli-Q. Кювети теж охолоджували на льоду. Переносили суміш клітин і вектора в холодну електропораційну кювету, зтрушували вниз, постукуючи. Ставили в камеру. Параметри для електропорації: 2,5 кВ, програма Есо 2, імпульс один раз. Після звукового сигналу, кювету швидко виймали з камери і додавали 1 мл поживного середовища АП (також додавали глюкозу) для відновлення клітин після імпульсу. Суспензію трансформованих клітин переносили з кювети в пробірку і ставили у термостат на 1 год при 37°C і 300 об/хв. Підросену культуру осаджували, відбирали 900 мкл середовища, осад розчиняли в 100 мкл, і висівали на чашки Петрі (середовище АП з тетрацикліном, карбініциліном).

Для виділення плазмідної ДНК відбирали 1,5 мл аліквоти рідкої бактеріальної культури, після чого бактерії осаджували при 10 000 об/хв протягом 30 с. Осад ресуспендували на вортексі 150 мкл розчину I. Після чого бактерії лізували, додаючи 300 мкл свіжоприготовленого розчину II (лізис-розчин). Через 3 хв додавали 225 мкл розчину III. Бактеріальний лізат

центрифугували 10 хв при 6 000 $\times g$ за температури 4 °С. Отриману таким чином плазмідну ДНК піддавали депротейнізації. Для цього відбирали надосадову рідину в нову пробірку і додавали 400 мкл суміші хлороформ:ізоаміловий спирт (24:1). Після чого, пробірки центрифугували при швидкості 6 000 $\times g$ протягом 5 хв. Таким чином білкова фракція осаджувалась. Відбирали 500 мкл верхньої безбілкової фракції і переносили у нову пробірку. До відібраного розчину додавали 300 мкл ізопропанолу і перемішували. Після цього пробірки залишали на 20 хв при кімнатній температурі. Потім плазмідну ДНК осаджували центрифугуванням при 6 000 $\times g$ протягом 10 хв. До пробірок додавали 1 мл 70 %-го розчину етанолу і знову центрифугували при 12 000 об/хв протягом 5 хв. Обережно зливали супернатант, після чого додавали знову 1 мл 70 %-го етанолу і інкубували у термостаті при температурі 50 °С протягом 5 хв. Очищену таким чином плазмідну ДНК розчиняли в 20 мкл ТЕ буфера pH 8,0.

Електрофоретичне розділення вставки та плазмідного вектора проводили в агарозному гелі. Для електрофоретичного розділення використовували 0,5-кратний трис-боратний буфер. Розділення вставки та плазмідни проводили в 1,2 % агарозному гелі, попередньо обробивши плазмідну рестрикційним ендонуклеазним ферментом HindIII. Агарозний гель (50 мл) розігрівали в скляній банці до розчинення, після чого оходжували до 55 °С і додавали 7 мкл етидидій-броміду. Далі гель заливали в плашку. Після полімеризації гелю, додавали буфер так, щоб він покривав об'єм над гелем висотою приблизно 1 мм. Розчин плазмідної ДНК попередньо нагрівали на водяній бані при температурі 50–60 °С. Після чого до розчину з плазмідною ДНК додавали барвник бромфеноловий синій, перемішували і переносили в лунки в агарозному гелі. Електрофоретичне розділення проводили при напрузі 5 В/см.

Сиквенування послідовностей мітохондріальної ДНК проводилося відділом біосинтезу нуклеїнових кислот Інституту молекулярної біології та генетики НАН України за допомогою ДНК аналізатора Applied Biosystems

моделі 3130 за методом Сенгера. Зразок був високоочищеним, вільним від РНК. Для виділення бажано застосовувати колонки або осаджувати плазмідну ДНК ПЕГ 8000. Очищення лише фенолом і хлороформом не бажане. Плазміда або виділений з гелю ПЛР фрагмент розчинявся у воді, або ТЕ буфері рН 8,0 концентрацією 200–500 нг/мкл. Кількість зразка для однієї реакції варіювала. Для сиквенування використовувався праймер M13REV. Праймери поставлялися концентрацією 4 мМ, тобто 2 мкл 100 мкМ маточного розчину розводили у 48 мкл води. Зазвичай витрачалося близько 1 мкл розчину праймера для однієї реакції. Результати сиквенування отримували електронною поштою у вигляді хроматограми та нуклеотидної послідовності.

Біоінформатичний аналіз сиквенованих послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica* проводили, застосовуючи алгоритм BLAST NCBI (BLAST – basic local alignment search tool; що є ресурсом, який найбільш часто використовується для розрахунку подібності послідовностей, підтримується National Center for Biotechnology Information). BLAST має варіації для використання із різними послідовностями-запитами до різних баз даних. Група програм для аналізу нуклеотидних послідовностей, включає такі алгоритми: Megablast – для швидкого порівняння, з метою знаходження високогомологічних послідовностей. Dmegablast – для швидкого порівняння, з метою пошуку дивергентних послідовностей, що мають низьку спорідненість. Blastn – для повільного порівняння, з метою пошуку усіх подібних послідовностей. BLAST використовує статистичну теорію для генерування ваги вирівнювання та очікуваного значення (E-value) для кожної пари вирівнювання (Румянцева та ін., 2012).

Вага вирівнювання дає уявлення про те, наскільки добре відбулося вирівнювання: чим вище вага, тим краще вирівнювання. Загалом, ця оцінка розраховується за формулою, що враховує вирівнювання аналогічних або ідентичних залишків, а також будь-які проміжки, які були введені, щоб вирівняти послідовності:

$$E = m * n * 2 - B,$$

де B – величина, що показує рівень подібності послідовностей, m – довжина досліджуваної послідовності, n – довжина послідовності бази даних (Національний центр для біотехнологічної інформації GenBank[®] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ключовим елементом у даному розрахунку, є «матриця замінів», яка привласнює рейтинг при вирівнюванні будь-якої можливої пари залишків. Вага вирівнювання нормується, а це означає, що ваги із різних вирівнювань можна порівняти, навіть якщо були використані різні матриці з надання балів ваги.

E -число дає уявлення про статистичну значимість даного парного вирівнювання і відображає розмір бази даних і систему підрахунку балів, яка використовується. E -число для вирівнювання – це очікувана кількість послідовностей, які показують однакове чи краще Z -число (Z -score) якщо в базу даних заносити випадкові послідовності. Z -число є виміром того, наскільки незвичайним чи оригінальним є співпадіння погляду середнього значення та стандартного відхилення отриманих балів ваги. Для вимірювання E -числа також необхідно враховувати P -число. P -число виражає вірогідність того, що вирівнювання не випадкове. Відношення Z - та P -чисел залежить від розподілу балів у популяції-контролі, яка не вкладається у нормальне розподілення. E знаходять шляхом множення значення P на розмір досліджуваної бази даних.

Чим нижче E -число, тим більша значущість вирівнювання. Вирівнювання послідовностей, яке має E -число 0,05 означає, що ця схожість має 5 із 100 (1 з 20) шансів, що відбулося випадкове співпадіння. Хоча із статистичної точки зору можна вважати це вирівнювання значимим, воно все ще може не представляти собою біологічно важливого результату і при аналізі вирівнювання має бути визначена біологічна значимість.

Дослідження проводили в три етапи. На першому етапі проводилось виділення ДНК та РНК, її очищення та клонування. На другому етапі

проводився відбір найбільш перспективних клонів та їх сиквенування, а на третьому – аналіз просиквенованих послідовностей та їх порівняння із вже відомими геномами.

Для виділення мітохондріальної ДНК та створення бібліотеки рекомбінантних клонів спочатку виділену ДНК піддавали рестрикції ендонуклеазним ферментом HindIII. Отримані послідовності клонували у плазмідний вектор pUC19 та розмножили у клітинах *E. coli* XL-1 Blue. Було створено бібліотеку рекомбінантних клонів. Величина клонованих послідовностей коливалася в межах від 200 до 4000 п.н. При цьому зустрічалися фрагменти однакової довжини, для розділення яких використовувались три суміші різних ендонуклеаз рестрикції (рис. 3.17). В першій суміші використовували ферменти HindIII, EcoRI, PstI, в другій – HindIII, EcoRI, SalI, в третій – HindIII, EcoRI, PstI, SalI (табл. 3.4).

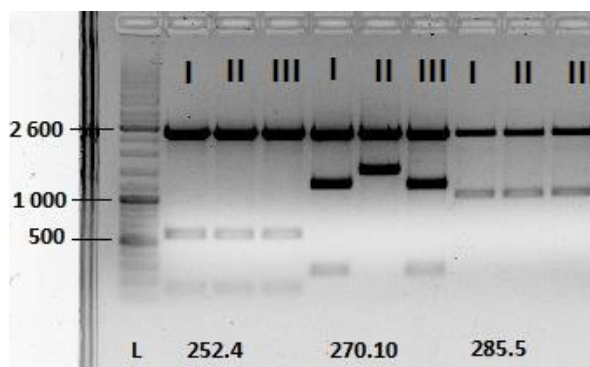


Рис. 3.17. Електрофореграма гідролізу рекомбінантних клонів pDac. L – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; арабськими числами позначено номер клона; римськими числами позначено рестрикційну суміш, яку використовували для аналізу: I – HindIII, EcoRI, PstI; II – HindIII, EcoRI, SalI; III – HindIII, EcoRI, PstI, SalI.

На другому етапі проводилось сиквенування відібраних фрагментів. Відібрані клони сиквенувалися з праймеру M13REV. Сиквенування проводилось в Інституті молекулярної біології та генетики НАН України відділом біосинтезу нуклеїнових кислот за методикою, описаною вище. Було відсиквеновано шість клонів. Дві із шести сиквенованих послідовностей (клони pDac15 та pDac22) дали незадовільний результат при сиквенуванні,

що може бути пояснено можливим забрудненням чужорідною ДНК, або недостатньою очисткою компонентів суміші.

Таблиця 3.4

Розподіл рекомбінантних клонів рDac за електрофоретичним розділенням після обробки сумішами чотирьох ендонуклеаз

Клон рDac*	HindIII	HindIII, EcoRI, PstI	HindIII, EcoRI, SalI	HindIII, EcoRI, PstI, SalI
252.6	4000, 100	4000, 100	4000, 100	4000, 100
270.9	1700	—	—	—
270.10	1500	1500	1100, 400	1100, 400
295.3	1500	1000	1000	1000
293.7	1350	1000, 350	1350	1000, 350
305	1200, 100	—	—	—
252.1	1200	700, 500	700, 500	700, 500
252.7	1200	700, 500	700, 500	700, 500
252.10	1200	700, 500	700, 500	700, 500
283.5	1000	1000	1000	1000
285.7	1000	1000	1000	1000
307	1000	1000	900, 100	900, 100
205.3	800, 700	—	—	—
270.4	800	600, 200	600, 200	600, 200
290.3	300	—	—	—
290.1	200	—	—	—

Примітки: * – Для більшої наочності клони впорядковано за величиною вставки у HindIII сайті. Знак «—» означає, що рестрикційний аналіз не проводили. Розмір вставки вказано у п.н.

Довжина сиквенованого фрагмента клону рDac.270.4 була 948 п.н., клону рDac.270.10 – 944 п.н., рDac.283.5 – 935 п.н., рDac.295.3 – 936 п.н.

На третьому етапі аналізували просиквеновані послідовності і порівнювали їх із вже відомими мітохондріальними геномами. Аналіз результатів сиквенування фрагментів мтДНК здійснювався за допомогою програми Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) на сайті NCBI шляхом порівняння з уже відомими нуклеотидними послідовностями Генетичного банку (GenBank) (Національний центр для біотехнологічної інформації GenBank® <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Порівняльний аналіз генетичних послідовностей вставок вказав на наявність наступних генів:

- pDac.270.4 – 1-а та 5-та субодиниці NADH-дегідрогенази;
- pDac.270.10 – рибосомальна РНК 26S та відкрита рамка зчитування;
- pDac.283.5 – 1-а субодиниця NADH-дегідрогенази;
- pDac.295.3 – 1-а та 5-та субодиниці NADH-дегідрогенази.

Була виявлена гомологія до представників родини злакових (*Poaceae*). Найбільша гомологія спостерігалася до ділянок мітохондріальних геномів пшениці (*Triticum aestivum*), рису (*Oryza sativa*), бамбуку (*Bambusa oldhamii*):

- pDac.270.4 – *T. aestivum* (98 %);
- pDac.270.10 – *O. sativa Indica Group* (91 %);
- pDac283.5 – *B. oldhamii* (98 %), *T. aestivum* (97 %);
- pDac.295.3 – *B. oldhamii* (99 %), *T. aestivum* (98 %).

Також спорідненість спостерігалась до видів *Sorghum bicolor*, *Zea mays* та ін. Наявність варіабельності у послідовностях дає підстави припускати, що саме ці варіабельні ділянки можуть відповідати за унікальні властивості щучника антарктичного.

Таким чином, слід відмітити, що вдалося виділити ДНК генів NADH-дегідрогенази щучника антарктичного з мітохондрій. Ці послідовності було збережено у векторі pUC19, сиквеновано і порівняно з відомими послідовностями. Спостерігається висока гомологія мітохондріальних послідовностей генів 1-ої та 5-ої субодиниць NADH-дегідрогенази, 26S рибосомальної РНК щучника з послідовностями представників родини Злакових (*T. aestivum*, *O. sativa*, *B. oldhamii* та ін.).

На підставі проведених досліджень можна зробити такі узагальнення:

- розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин;
- визначено структуру гена *shp1* модельного виду – моху *Physcomitrella patens* та підтверджено факт наявності подібних послідовностей в різних таксонах рослин;

- для виявлення досліджуваної генетичної послідовності в зразках мохів підбрано дві пари праймерів: SHP1F1–SHP1R1 та SHP1F3–SHP1R3. У більшості проаналізованих зразків мохів ампліфіковано фрагменти цієї послідовності на матриці ДНК та кДНК, що може свідчити про наявність у них гена *shp1*. У деяких видів спостерігається виражена варіабельність довжини отриманих фрагментів, що можна пояснити поліморфізмом даного гена через видову віддаленість. Найбільша подібність отриманих фрагментів виявлена у *P. patens* та *Warnstorfia fontinaliopsis*;
- для аналізу кДНК бажано використовувати пару праймерів SHP1F1–SHP1R1, які гібридизуються з консервативними ділянками гена. Для аналізу ДНК бажано використовувати пару праймерів SHP1F3–SHP1R3, які ампліфікують весь ген *shp1*;
- виділено кодуючу послідовність ДНК генів малих гідрофобних білків SHP та проведено її клонування у вектор pUC19. Сиквеновано послідовності кДНК білків SHP1 та SHP2 *Warnstorfia fontinaliopsis*. Порівняльний аналіз отриманої нуклеотидної послідовності з референтним геномом *Physcomitrella patens* виявив одну значиму заміну в амінокислотній послідовності білка SHP1;
- виділено ДНК генів NADH-дегідрогенази щучника антарктичного та певні їх послідовності клоновано у вектор pUC19. Створено бібліотеку рекомбінантних клонів;
- сиквеновано і проведено аналіз нуклеотидних фрагментів мітохондріального геному *D. antarctica*. Встановлено наявність в мітохондріальній ДНК генів 1-ої та 5-ої субодиниць NADH-дегідрогенази, 26S рибосомальної РНК;
- проведено біоінформатичний аналіз послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica*. Показана висока (понад 90 %) гомологія з мітохондріальними геномами представників родини Злакових (*T. aestivum*, *O. sativa*, *B. oldhamii* та ін.).

Публікації пошукача, видані за даним розділом:

1. Makarenko R., Savchuk O., Rumianceva A., Ivashchuk B., Cherep M., Gorobec S., **Morgun B.**, 2013. Cloning and molecular-genetic analysis *Deschampsia antarctica* mitochondrial sequences. *Вісник Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Біологія*. Вип. 2(64), Р. 45–47.
2. Макаренко Р.О., Івашук Б.В., Савчук О.П., Румянцева А.Є., Череп М.Н., Матвєєва Н.А., Кучук М.В., **Моргун Б.В.**, 2012. Клонування і молекулярно-генетична характеристика послідовностей ДНК хлоропластів та мітохондрій *Deschampsia antarctica* Desv. *Modern Phytomorphology*. V. 2, Р. 261–263. DOI: 10.5281/zenodo.162675
3. Villani M.E., **Morgun B.**, Brunetti P., Marusic C., Lombardi R., Pisoni I., Bacci C., Desiderio A., Benvenuto E., Donini M., 2009. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), Р. 59-72.
4. **Моргун Б.В.**, Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. – Киев: Логос, 2014. – 221 с.
5. Makarenko R.O., Savchuk O.P., Cherep M.N., **Morgun B.V.**, 2013. Cloning and molecular genetic analyses of *Deschampsia antarctica* mitochondrial DNA sequences. *Conference Proceedings. Cell Technology Week*. Kyiv, 14-17 May, Р. 52.
6. Макаренко Р.О., Марковський О.В., **Моргун Б.В.**, Кучук М.В. Клонування послідовностей генів SHP1 малого гідрофобного білка антарктичних мохів. Біологія рослин та біотехнологія. *Матеріали II конференції молодих учених 24-25 грудня 2013 року, ІХБіГ НАНУ, Київ*, С. 29.
7. Савчук О.П., Жолнер Л.Г., Макаренко Р.О., Череп М.Н., **Моргун Б.В.** Молекулярне дослідження ДНК послідовностей вищих рослин Антарктики. Біотехнологія XXI століття - Тези доповідей VII Всеукраїнської

науково-практичної конференції, присвяченої 115 річниці заснування НТУУ “КПІ” - 24 квітня 2013 року - С. 83-84.

8. Румянцева А.Є., Савчук О.П., Макаренко Р.О., Череп М.Н., Горобець С.В., **Моргун Б.В.** Характеристика клонованих послідовностей ДНК щучника антарктичного засобами NCBI. - Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції “Біотехнологія XXI століття” НТУУ “КПІ” - 5 квітня 2012 року - С. 99-100.

9. Савчук О.П., Макаренко Р.О., Румянцева А.Є., Череп М.Н., Жолнер Л.Г., **Моргун Б.В.** Порівняльний аналіз послідовностей мітохондріальної ДНК *Deschampsia antarctica*. Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції “Біотехнологія XXI століття” НТУУ “КПІ” - 5 квітня 2012 року - С. 108-109.

10. Ivaschuk B.V., Rumiantseva A.Ye., Cherep M.N., Matvieieva N.A., **Morgun B.V.** Cloning and chloroplast DNA sequence analysis of Antarctic tussock (*Deschampsia antarctica*). V Міжнародна антарктична конференція «Антарктика і глобальні системи Землі: нові виклики та перспективи». Київ, 2011. – С. 213-214.

11. Макаренко Р.А., **Моргун Б.В.** Клонирование и биоинформатический анализ последовательностей кДНК генов SHP малых гидрофобных белков антарктических мхов. Вторая летняя школа по биоинформатике (Санкт-Петербург, 27 июля – 1 августа 2014 года). Тезисы докладов. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2014. – 42 с. С. 33-34.

РОЗДІЛ 4

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ

Створення генетично модифікованих рослин сільськогосподарських культур є актуальним напрямом сучасного генетичного поліпшення рослин. На сьогодні у генетичній інженерії злаків, в тому числі і пшениці, широко використовується метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації (Binka et al., 2012; Mamrutha et al., 2014). Даний метод має декілька переваг порівняно з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною їх перебудовою, простота методик та загалом менша вартість.

Розробку різних методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці проводять з кінця 1980-х років, але ефективність їх використання досі дуже низька і не перевищує 1–2 % (Hiei et al., 2014) через те, що пшениця не є природною рослиною-хазяїном *Agrobacterium tumefaciens*. Протягом багатьох десятиліть вона вважалася доволі непридатним для трансформації об'єктом в основному внаслідок нездатності до утворення калюсу в природних умовах, низької ефективності регенерації в умовах *in vitro*, відсутності специфічних сигнальних молекул, які індукують *Vir*-область і вирізання Т-ДНК. Проте удосконалення технологій *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації до кінця 1990-х років, привело до бажаної генетичної модифікації пшениці (Cheng et al., 1997; Jones et al., 2005).

Ефективність застосування даного методу значною мірою залежить від всіх факторів, які безпосередньо впливають на процес перенесення трансгенів, розробки ефективного протоколу, а також від чіткого виконання всіх етапів роботи. Процес генетичної трансформації за допомогою агробактерій включає наступні кроки: вилучення/клонування генів інтересу з вихідного організму; створення ефективної векторної конструкції, яка б

включала ген інтересу, промотори та інтрони, маркерні гени для покращення ідентифікації трансформантів, а також енхансери для підвищення експресії генів інтересу; перенесення Т-ДНК-вмісної плазмиди в *Agrobacterium*; власне перенесення Т-ДНК від *Agrobacterium* у рослинні клітини; аналіз експресії перенесеного гена в отриманих рослинах (Dokumbo et al., 2015).

Проте, використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Для успішної трансформації пшениці за допомогою *A. tumefaciens* в культурі *in vitro* необхідно мати ефективну систему культивування, яка ґрунтується на використанні таких базових елементів як компетентний генотип, тип експланта, склад живильних середовищ. Важливою для підвищення ефективності процесу є оптимізація умов культивування експлантів з метою мінімізації загибелі рослинних клітин після трансформації, та розробка селективної системи, яка б давала можливість відібрати трансформанти. Незважаючи на те, що регенерація цілої рослини з культивованих калюсних клітин даної культури описана у численних роботах (Zale et al., 2004; Yu, 2012) удосконалення системи культивування і підвищення кількості рослин-регенерантів залишається актуальною задачею.

Agrobacterium-опосередкована трансформація *in planta* – це один із сучасних вискооефективних методів створення трансгенних рослин. Він дозволяє уникнути використання культури тканин *in vitro*, тим самим зменшуючи собівартість та довготривалість експериментів, а також дозволяє уникнути соматональної мінливості, яка зустрічається під час генетичної трансформації і регенерації *in vitro*. Особливістю цього методу є те, що *Agrobacterium*-опосередкована трансформація проводиться на рослинах, що вільно ростуть в природних умовах. Цей метод дозволяє використовувати для трансформації широкий перелік сортів, навіть тих, в яких ускладнений процес індукції калюсу та регенерації рослин. Ефективність трансформації за допомогою цього методу залежить від низки специфічних факторів, зокрема

щільності суспензії агробактеріальних клітин, складу інокуляційного середовища, умов навколишнього середовища (Чумаков, Моисеева, 2012; Moiseeva et al., 2014; Borisjuk et al., 2019).

Отже, проведено та проводиться багато досліджень з оптимізації методик, за використання яких підвищується ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці (Patnaik et al., 2006, Yao et al., 2007, Mitić et al., 2014). Основні зусилля спрямовані на встановлення та дослідження всіх чинників, які впливають на процес трансформації та розробку нових протоколів, які б забезпечували високу ефективність отримання біотехнологічних рослин даної культури, а також легко відтворювалися у різних лабораторіях. У зв'язку з цим, метою нашої роботи була оптимізація окремих параметрів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці в культурі *in vitro* та методом *in planta*, а також отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів.

4.1. Оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*

Процес добору оптимального живильного середовища – основа біотехнології рослин, і зокрема пшениці, тому нами була проведена його оптимізація шляхом варіювання синтетичних регуляторів росту. Вихідний матеріал (апикальні меристеми, а в подальшому і калюс) отримували за розробленою нами методикою: стерилізація насіння, отримання 3-добових проростків, виділення апикальних меристем, та отримання повністю сформованого 18-добового первинного калюсу (рис. 4.1).

Було проведено вивчення впливу БАП у різних концентраціях при сталому вмісті дикамби (0,2 мг/л) та піклораму (0,15 мг/л) на частоту регенераційних процесів. Як базове використовували середовище МС доповнене вітамінами за Гамборгом та 10 мг/л AgNO_3 . При внесенні 1 мг/л

БАП у регенераційне середовище МС (середовище МСР12, табл. 4.1), на 35-ту добу культивування спостерігали найвищу частоту регенерації (рис. 4.2).

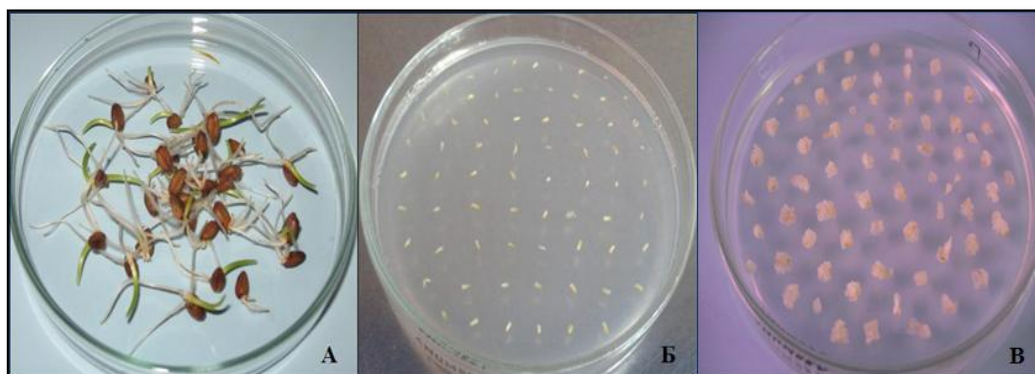


Рис. 4.1. **А** – проростки пшениці сорту Зимоярка на 3-тю добу пророщування; **Б** – виділені апікальні меристеми; **В** – 18-добовий калюс.

Таблиця 4.1

Модифіковані живильні середовища, використані при дослідженні частоти регенерації пагонів пшениці

Середовище	Регулятори росту
МСР1	1 мг/л БАП; 0,2 мг/л дикамба
МСР2	1 мг/л БАП; 0,4 мг/л дикамба
МСР3	1 мг/л БАП; 0,6 мг/л дикамба
МСР4	0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам
МСР5	0,5 мг/л БАП; 0,25 мг/л піклорам
МСР6	0,5 мг/л БАП; 0,5 мг/л піклорам
МСР7	0,15 мг/л піклорам; 0,5 мг/л БАП
МСР8	0,15 мг/л піклорам; 0,75 мг/л БАП
МСР9	0,15 мг/л піклорам; 1 мг/л БАП
МСР10	0,2 мг/л дикамба; 0,5 мг/л БАП
МСР11	0,2 мг/л дикамба; 0,75 мг/л БАП
МСР12	0,2 мг/л дикамба; 1 мг/л БАП
контроль	
МСК1	1 мг/л БАП
МСК2	0,5 мг/л БАП
МСК3	0,2 мг/л дикамба
МСК4	0,15 мг/л піклорам

Калюс відзначався високим відсотком морфогенезу (81,3 %) та задовільним фізіологічним станом. При зменшенні вмісту досліджуваного регулятора росту до 0,75 мг/л (середовище МСР 11) кількість утворених

пагонів помітно зменшувалась (табл. 4.2). Мінімальна кількість регенерантів спостерігалась на регенераційному середовищі МСР 10.

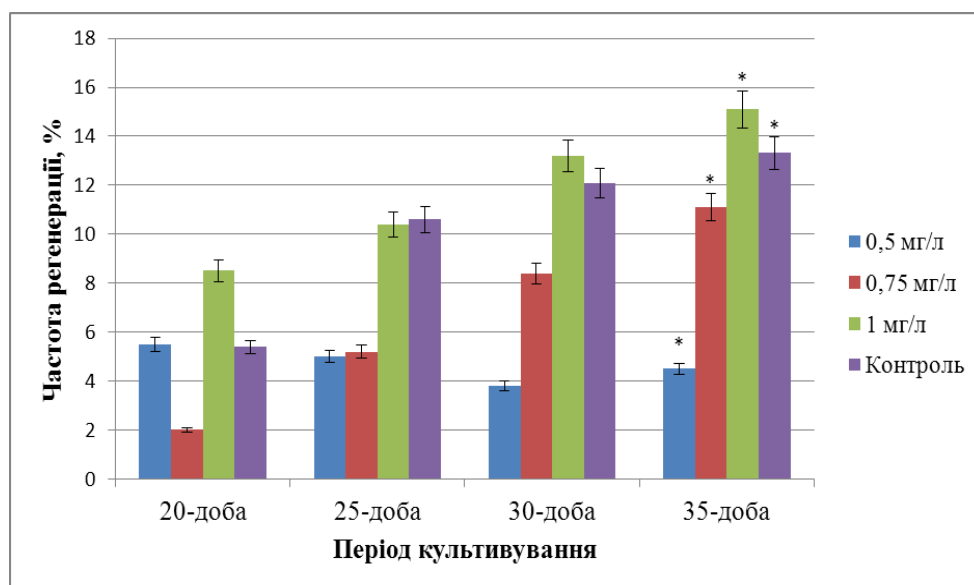


Рис. 4.2. Залежність частоти регенерації від вмісту у живильному середовищі різних концентрацій БАП у поєднанні з 0,2 мг/л дикамби. Контроль – середовище для регенерації МСКЗ.

При внесенні 0,5 мг/л БАП у живильне середовище МС, доповнене піклораом (0,15 мг/л) (середовище МСР4), спостерігали максимальне пагоноутворення порівняно з контролем та відсотком регенерації на середовищах, які містили інші концентрації БАП. Підвищення вмісту даного фітогормону (середовища МСР8 та МСР9, табл. 4.1) спричиняло зниження регенераційної активності, проте позитивно впливало на морфогенетичні процеси у калюсі пшениці (табл. 4.2). Для подальшої роботи з культурою калюсної тканини пшениці *in vitro* було відібрано регенераційне середовище МСР4.

За наявності у живильному середовищі дикамби спостерігається нижчий відсоток утворених регенерантів, оскільки значна частина калюсу залишається неморфогенною, переходить у стаціонарну фазу росту та проявляє ознаки старіння.

Нами вперше вивчено вплив синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – піклорама та дикамби – на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження.

Таблиця 4.2

Вплив фітогормонів та синтетичних регуляторів росту на частоту регенерації (%) двох генотипів пшениці

Сорт Зимоярка									
БАП	Дикамба					Піклорам			
	Конц. мг/л	0	0,2	0,4	0,6	0	0,15	0,25	0,5
	0	5,4± 1,5 %	13,3± 1,6			5,4± 1,5	28,3± 1,6		
	0,5		4,5± 0,4				35,5± 0,6*	25,1± 1,1	25± 1,1
	0,75		11,1± 1,1				15,0± 0,5		
	1		15,1± 0,6*	12,1± 1,0*	3,7± 0,2		20,6± 0,9		
Сорт Подолянка									
БАП	Дикамба					Піклорам			
	Конц. мг/л	0	0,2	0,4	0,6	0	0,15	0,25	0,5
	0	5,4± 1,5				5,4± 1,5			
	0,5	20,6± 0,5	23,3± 1,5			20,6± 0,5	30,8± 0,4		
	0,75	20± 1,0	22,8± 1,8			20± 1,0	15,7± 0,8		
	1	29,3± 1,1	20± 0,8			29,3± 1,1	18,7± 1,2		

Примітка: * $p \leq 0,05$, конц. – концентрація.

Аналіз літературних джерел (Wu et al., 2003; Sharma et al., 2005; Гончарук та ін., 2014) показав, що ці речовини зазвичай використовували як додаткові компоненти регенераційних середовищ, тому їх морфогенетичний ефект не було описано раніше.

Було проведено дослідження по з'ясуванню впливу БАП у поєднанні з дикамбою або піклорамам на регенерацію пагонів з первинного калюсу пшениці. Для цього визначали вплив різних концентрацій дикамби (0,2–0,6 мг/л) або піклорама (0,15–0,5 мг/л) за сталої концентрації БАП. Загалом

було протестовано 12 варіантів (табл. 4.1.) модифікованого середовища МС, доповненого різними концентраціями регуляторів росту. При дослідженні впливу дикамби контрольним виступало середовище МСК1; при вивченні впливу піклораму – МСК2.

Нами показано, що найбільш ефективним є використання у середовищі 0,2 мг/л дикамби (середовище МСР1, табл. 4.1) за якого спостерігалось швидке утворення морфогенних ділянок та найбільшої кількості пагонів. Впродовж усього періоду культивування некрозу не спостерігали, постійно з'являлися нові пагони, тобто калюс зберігав морфогенну здатність (рис. 4.3). На пізніших етапах дослідження (30–35 доба) кількість новоутворених регенерантів поступово зменшувалась, а калюс втрачав здатність до морфогенезу. При додаванні в модифіковане живильне середовище більших концентрацій дикамби (0,4–0,6 мг/л) відбувається сповільнення росту калюсу, зниження частоти утворення морфогенних зон і регенерації. Слід зазначити, що при внесенні 0,6 мг/л дикамби регенерація розпочиналась значно пізніше – на 30-ту добу.

Проведено також вивчення впливу різних концентрацій піклораму (при сталому значенні БАП – 0,5 мг/л) на регенерацію з морфогенного калюсу. При додаванні в регенераційне середовище піклораму у низьких концентраціях відбувається стимуляція морфогенетичних процесів.

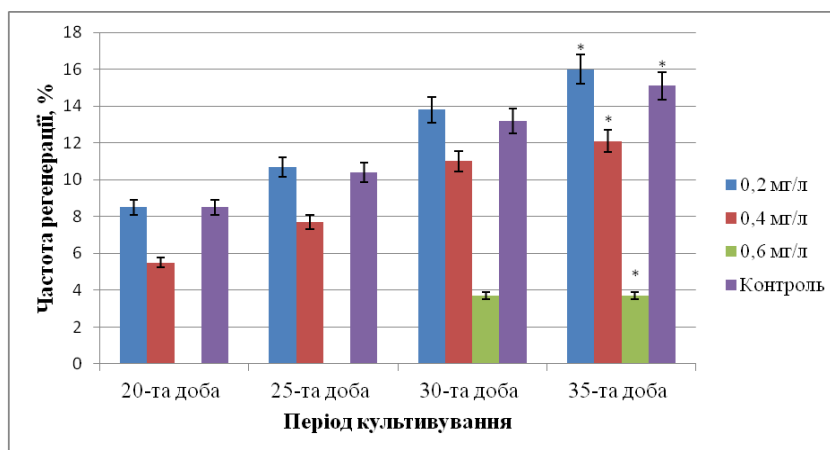


Рис. 4.3. Вплив різних концентрацій дикамби в поєднанні з 1 мг/л БАП на регенераційну здатність калюсних культур пшениці сорту 'Зимоярка'.

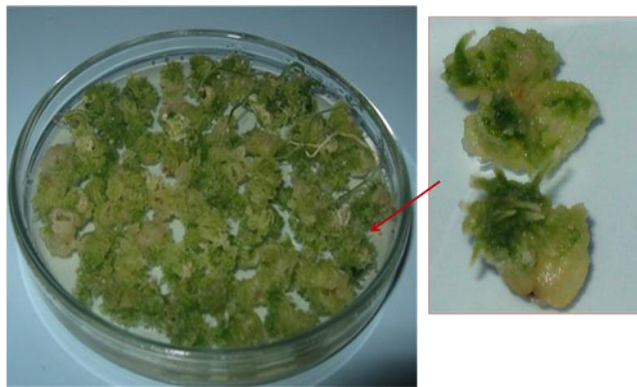


Рис. 4.4. Органогенез культивованих калюсів пшениці на середовищі для регенерації МСР2.

За найнижчої дослідженої концентрації (0,15 мг/л) піклораму (середовище МСР4) утворювалась найбільша кількість морфогенних осередків (до 70 %), а також регенерантів на 30–35-ту добу культивування (рис. 4.5). Збільшення концентрації піклораму до 0,25–0,5 мг/л (середовища МСР5 та МСР6, табл. 4.1) спричинило зменшення кількості морфогенних зон порівняно з нижчою концентрацією на 10 % та 36,4 %, відповідно. Також спостерігався некроз калюсу та зниження регенераційної активності. Таким чином, підвищення концентрації піклораму в регенераційному середовищі загалом негативно впливає на морфогенетичну здатність калюсу та регенерацію пагонів у пшениці.

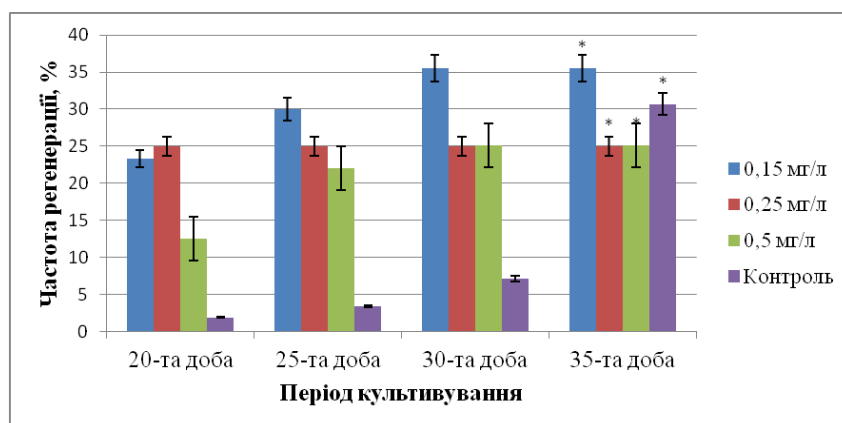


Рис. 4.5. Частота регенерації пагонів із калюсу на живильному середовищі МС, доповненому різними концентраціями піклораму в поєднанні з 0,5 мг/л БАП. Контроль – модифіковане живильне середовище для регенерації МСК2.

Отже, для активного утворення морфогенних зон, а також ефективної регенерації пагонів доцільно використовувати живильне середовище MCR4 (0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам). Саме на цьому середовищі утворюється найбільша кількість рослин-регенерантів, які добре адаптуються до асептичних умов.

4.1.1. Застосування антибіотика β -lactam групи тиментину для елімінації *Agrobacterium tumefaciens*

З метою усунення агробактеріальної контамінації використовують різні антибіотики (Haddadi et al., 2015). Відомо, що антибіотики, присутні у живильному середовищі, впливають на регенерацію з експлантів, культивованих *in vitro*. Їх вплив може бути негативним або позитивним (Reddy et al., 2012). Чутливість рослин до антибіотиків є видоспецифічною і залежить, в основному, від їх концентрації, типу експланта та умов культивування. Тому, перш ніж їх застосовувати для елімінації небажаних мікроорганізмів, необхідно визначити тип і концентрацію антибактеріального агента з найменшим фітотоксичним впливом на рослинні клітини. Як правило, препарати беталактамної групи вважаються не токсичними для клітин рослин через їх специфічну дію на бактерії (Grzebelus, Skor, 2014), але в деяких випадках продукти розпаду цих антибіотиків у живильному середовищі можуть по-різному впливати на ріст рослинної клітини. Їх фітотоксичність може значно варіювати залежно від концентрації антибіотика та виду рослин (Farzaneh et al., 2013).

Антибіотики групи β -лактамів викликають лізис бактерій шляхом специфічного втручання в біосинтез пептидоглікану клітинної стінки бактерій: інгібують ферменти транспептидазу та карбоксипептидазу (пеніцилін-зв'язуючі білки (PBPs)), які каталізують реакції синтезу пептидоглікану (Yarizade et al., 2012; Farzaneh et al., 2013; Tran, Sanan-Mishra, 2015). Рослинні клітини не мають жодних відомих мішеней для β -лактамів,

однак дані речовини можуть впливати як позитивно, так і негативно на органогенез чи ембріогенез (Nauerby et al., 1997). Найбільш важливими представниками β -лактамів є карбеніцилін, який відноситься до класу пеніцилінів, та цефотаксим, що належить до цефалоспоринів. Останній активно застосовують в якості ефективного антибіотика для інгібування росту агробактеріальних клітин, оскільки він має мінімальний токсичний ефект на більшість рослин та характеризується спектром дії на грампозитивні та грамнегативні бактерії (Panathula et al., 2014). Низька концентрація цефотаксиму підвищує регенерацію пагонів у кукурудзи (Danilova, Dolgikh, 2004), пшениці (Дубровна та ін., 2012), яблуні (James et al., 1989) тощо, а підвищення концентрації знижує ефективність утворення пагонів у зазначених культур, негативно впливає на регенерацію трансформованих експлантів і ріст пагонів у томатів (Mamidala, Nanna, 2009; Kazemi et al., 2014). Численні дослідження підтверджують негативний вплив високих концентрацій цефотаксиму (300 мг/л і вище) на органогенез, ембріогенез та регенерацію пагонів більшості видів рослин (Mendes et al., 2009, Yarzade et al., 2012). У β -лактум кільці та бічному ланцюзі цефотаксим містить 6-амінопеніциланову, фенілоцтову та фенілмалонову кислоти. Саме завдяки такій структурі забезпечується біологічна активність цього антибіотика у рослинах, яка призводить до втрати балансу фітогормонів при високій концентрації даного антибіотика і, як наслідок, зниження ефективності трансформації, регенерації і росту пагонів (Mamidala et al., 2009, Kazemi et al., 2014, Tran, Sanan-Mishra, 2015). З огляду на це, постає питання заміни цефотаксиму антибіотиками, які забезпечують ефективну елімінацію *A. tumefaciens* під час генетичної трансформації *in vitro* та водночас не знижують, а бажано підвищують частоту регенерації з трансформованих експлантів.

Як альтернативу цефотаксиму можна розглядати антибіотик тиментин. Тиментин складається з пеніцилінового похідного тикарциліну та клавуланової кислоти. Він характеризується високим ступенем інгібування

Agrobacterium tumefaciens. Показано, що тиментин підвищує органогенез з листкових експлантів *N. tabacum* (Nauerby et al., 1997) і сім'ядольних експлантів у томатів (Costa, 2000), однак пригнічує калюсогенез у полуниці (Haddadi et al., 2015). Ченг та співавт. (Cheng et al., 1998) зазначають, що тиментин можна розглядати як альтернативу для тих видів, в яких карбеніцилін і цефотаксим негативно впливають на регенерацію. Вплив тиментину на регенераційні процеси в м'якої пшениці раніше не вивчали, тому одним із завдань нашої роботи було визначення елімінуючої *Agrobacterium tumefaciens* концентрації даного антибіотика та встановлення його впливу на регенерацію *in vitro* пагонів м'якої пшениці сортів 'Зимоярка' та 'Подільянка'.

Ми порівнювали інгібуючий ефект антибіотиків цефотаксиму та тиментину на клітини *A. tumefaciens* штамів C58 та GV3101. Відомо, що тиментин повністю пригнічує ріст штамів: ЕНА 105 за концентрації 250 мг/л (Li et al., 2008) або 400 мг/л (Palla, Pijut, 2015); C58 – у концентрації 250 мг/л (Tang et al., 2000); LBA4404 – у концентрації 150 мг/л (Ling et al., 1998) або 400 мг/л (Mamidala et al., 2009); KYRT1 – за концентрації 50 мг/л (Han et al., 2007); GV3101 – у концентрації 200 мг/л (Li et al., 2008).

Для встановлення елімінуючих агробактерії концентрацій антибіотиків використовували метод дисків. Нами виявлено, що зона пригнічення діаметром 12,5 мм для штаму C58 та 10,5 мм для штаму GV3101 спостерігається під час використання концентрації 350 мг/л тиментину та 500 мг/л цефотаксиму (табл. 4.3, 4.4, рис. 4.6). Таким чином, тиментин більш ефективно пригнічує ріст агробактерії порівняно з цефотаксимом. У процесі збільшення концентрації антибіотиків збільшується і зона інгібування *A. tumefaciens*.

Таблиця 4.3

Зони інгібування *A. tumefaciens* штаму C58 за використання антибіотиків тиментину і цефотаксиму

Концентрація	Цефотаксим	Тиментин
100 мг/л	9,0 ± 0,3 мм	8,5 ± 0,8 мм
150 мг/л	9,0 ± 0,5 мм	10,5 ± 0,5 мм
200 мг/л	9,8 ± 0,7 мм	11,0 ± 0,5 мм
250 мг/л	10,0 ± 0,3 мм	11,0 ± 0,5 мм
300 мг/л	10,5 ± 0,5 мм	11,5 ± 0,5 мм
350 мг/л	11,0 ± 0,6 мм	12,5 ± 0,3 мм
400 мг/л	11,6 ± 0,4 мм	13,5 ± 0,3 мм
450 мг/л	12,0 ± 0,5 мм	14,0 ± 0,4 мм
500 мг/л	12,5 ± 0,5 мм	16,0 ± 0,6 мм

Механізм дії антибіотиків на рослинний організм достеменно не відомий, проте існує припущення, що антибіотики імітують рослинні регулятори росту, оскільки деякі з них мають ауксиноподібну структуру (Grzebelus, Skor, 2014). Стимулюючий вплив низьких концентрацій цефотаксиму на морфогенез і регенерацію було показано для калюсних культур кукурудзи (Danilova, Dolgikh, 2004), індійського рису (Grewal et al., 2006), м'яти перцевої (Sujana, Naidu, 2011), а також пшениці (Дубровна та ін., 2012). За останніми даними підвищення концентрації (до 250 мг/л) даного антибіотика підвищує частоту утворення пагонів у пшениці (Бавол та ін., 2014).

Таблиця 4.4

Зони інгібування *A. tumefaciens* штаму GV3101 за використання антибіотиків тиментину і цефотаксиму

Концентрація	Цефотаксим	Тиментин
100 мг/л	7,5 ± 0,6 мм	8,0 ± 0,5 мм
150 мг/л	8,0 ± 0,5 мм	9,0 ± 0,5 мм
200 мг/л	8,0 ± 0,5 мм	9,5 ± 0,3 мм
250 мг/л	8,5 ± 0,4 мм	10,0 ± 0,5 мм
300 мг/л	9,0 ± 0,3 мм	10,3 ± 0,3 мм
350 мг/л	9,5 ± 0,5 мм	10,5 ± 0,5 мм
400 мг/л	10,0 ± 0,7 мм	10,5 ± 0,7 мм
450 мг/л	10,0 ± 0,5 мм	11,0 ± 0,5 мм
500 мг/л	10,5 ± 0,4 мм	11,5 ± 0,4 мм

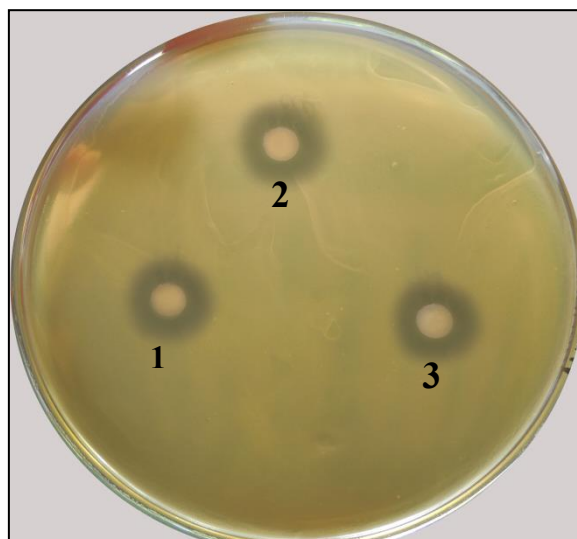


Рис. 4.6. Зони інгібування бактеріальних клітин досліджуваними антибіотиками: 1 – 350 мг/л тиментину, 3 – 500 мг/л цефотаксиму.

Тиментин (300 мг/л) вважається ефективним не лише для елімінації *A. tumefaciens* під час генетичної трансформації, а й для стимулювання регенераційних процесів (Costa, 2000).

Також одним із завдань нашої роботи було дослідити дію різних концентрацій тиментину на регенерацію з калюсу пшениці та встановити можливість використання антибіотика в якості додаткового регулятора росту подібно до дикамби та піклораму. Нами встановлено, що під час збільшення концентрації тиментину до 350 мг/л для обох сортів спостерігається зниження частоти морфогенезу (табл. 4.5), але вона залишається вищою порівняно з контролем, що свідчить про позитивний ефект його застосування.

Показано, що при додаванні тиментину у регенераційне середовище в концентрації 75 мг/л спостерігалася найменша кількість регенерантів у сорту ‘Зимоярка’ (табл. 4.5, рис. 4.7), а найбільша частота регенерації спостерігалась за концентрації 350 мг/л. У сорту ‘Подільська’ навпаки найбільше регенерантів ($\approx 35\%$) утворювалося саме при внесенні у живильне середовище мінімальних кількостей даного антибіотика (25 та 50 мг/л), а мінімальна кількість пагонів спостерігалась на середовищі з 500 мг/л тиментину (табл. 4.5).

Таблиця 4.5

**Вплив антибіотику тиментину на морфогенез і регенерацію з калюсу
пшениці м'якої**

Концентрація тиментину, мг/л	сорт Зиморяка			сорт Подолянка		
	Частота, %			Частота, %		
	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація	Морфогенез	Ризогенез	Регенерація
25	95,6±2,5	75,4±4,7	18,9±1,0	93,8±1,2	55,1±2,1	35,4±0,5
50	95,9±2,0	60,9±4,2	19,5±0,5	93,6±0,5	68,0±2,2	34,1±0,5
75	93,0±0,9	76,8±3,4	8,2±1,2	94,3±1,8	74,9±3,7	22,9±1,6
100	91,2±4,1	82,6±3,2	16,4±2,3	96,5±0,6	76,6±2,5	22,7±2,0
125	91,0±2,0	59,2±4,5	22,9±0,2	93,3±1,8	64,6±2,4	23,1±1,7
150	92,4±3,6	60,5±2,4	19,3±0,7	91,2±0,9	62,1±5,6	22,8±1,2
175	94,2±1,1	63,2±4,8	21,2±0,4	90,7±1,9	69,8±3,6	23,0±0,5
200	97,8±2,1	75,8±3,1	13,3±0,4	90,5±0,9	66,4±1,8	21,4±1,3
225	87,1±3,1	56,9±3,6	17,7±0,7	91,0±2,4	73,0±3,3	19,1±1,3
250	95,7±4,0	54,6±1,3	19,8±1,4	94,1±1,5	53,1±2,7	24,4±1,3
275	93,1±3,9	54,4±2,1	21,8±1,0	93,3±0,3	57,1±2,7	26,3±0,1
300	99,1±1,5	62,6±4,4	22,1±1,5	97,6±1,3	50,6±4,4	22,0±1,6
325	93,8±2,8	63,1±1,9	29,1±1,6	92,9±0,6	61,6±1,8	25,8±0,4
350	88,9±0,6	72,9±2,6	32,8±1,2	95,0±2,0	48,0±2,1	19,2±1,6
375	92,3±2,8	57,5±2,0	29,6±0,9	91,6±2,5	67,0±3,2	24,3±0,4
400	80,1±1,8	48,1±2,3	24,3±1,2	97,3±0,4	42,3±1,6	24,2±1,1
425	92,6±1,8	67,8±2,2	27,7±1,1	87,3±1,4	59,2±3,6	24,5±0,3
450	91,5±2,3	61,6±2,5	18,8±0,6	90,7±4,4	60,6±1,7	22,5±0,4
475	90,8±1,3	75,1±4,1	13,3±0,9	89,6±0,4	59,1±4,0	18,9±1,0
500	90,0±1,9	65,0±2,5	11,3±0,5	91,3±1,4	59,5±4,2	14,5±0,9
Контроль	76,5±1,6	75,7±1,7	26,5±1,6	55,8±1,6	31,0±1,8	25,5±2,4

Примітка: Тут і далі $p \leq 0,05$. Наведено середньоарифметичні дані.

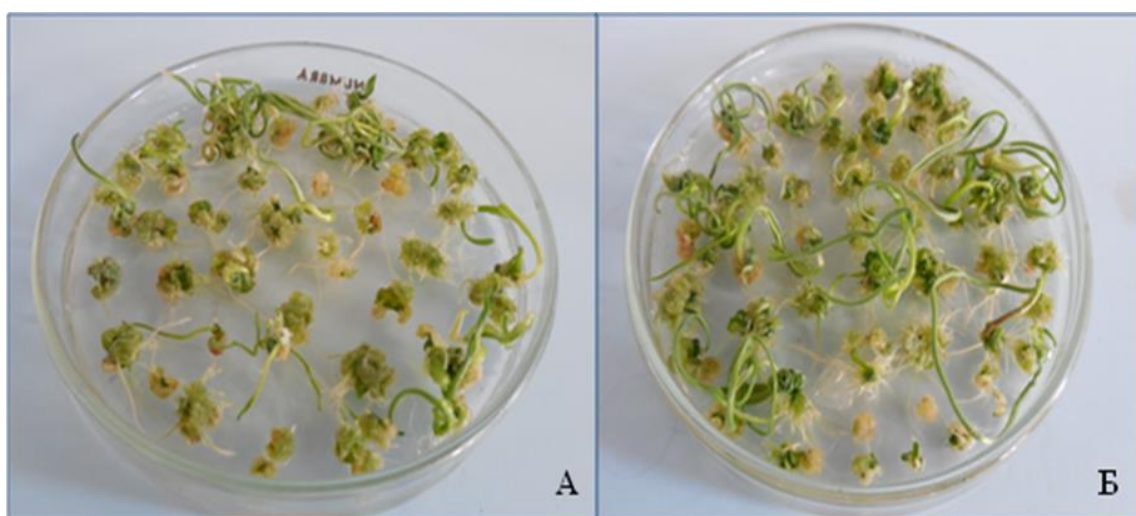


Рис. 4.7. Регенеранти сорту Зиморяка, утворені на регенераційному середовищі: без тиментину – контроль (А) та за його наявності у концентрації 350 мг/л (Б).

Нами показано, що наявність будь-якої кількості антибіотику тиментину стимулює утворення коренів в обох сортів пшениці. Так, за концентрації 100 мг/л тиментину відсоток утворення коренів для сортів ‘Зимоярка’ та ‘Подольанка’ був найбільшим (рис. 4.8).

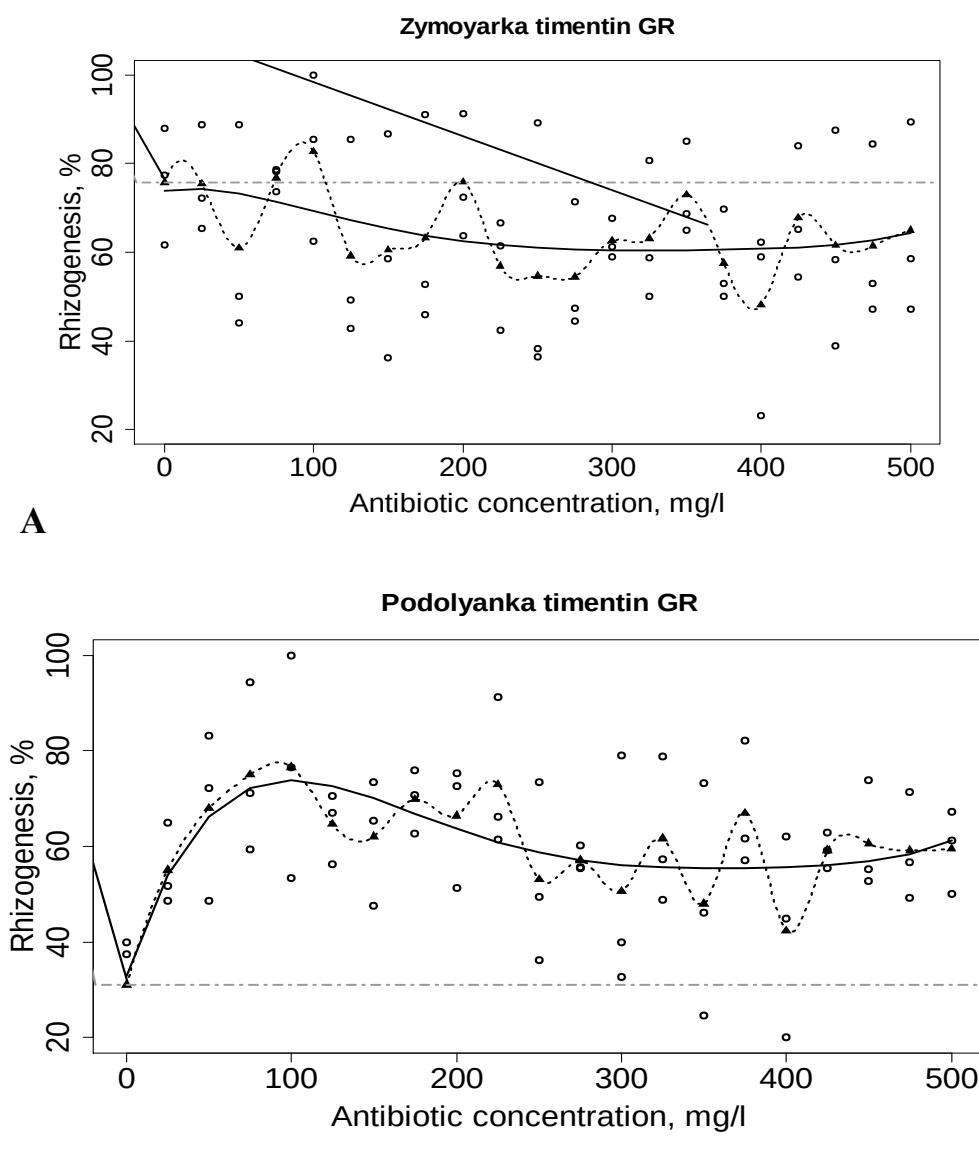


Рис. 4.8. Вплив тиментину на ризогенез калюсу пшениці сортів ‘Зимоярка’ (А) та ‘Подольанка’ (Б).

За використання тиментину некрозу калюсів і регенерантів не спостерігали. Таким чином, нами встановлено, що при застосуванні елімінуючих агробактерії концентрацій тиментину (350 мг/л) підвищується частота регенерації у двох сортів пшениці. Отримані за наявності у живильному середовищі різних концентрацій тиментину пагони здатні

утворювати корені та активно розвивати надземну частину. В обох сортів пагони утворюються в центральній частині калюсної одиниці та легко відокремлюються від неї.

Рослини-регенеранти з розвиненою кореневою системою легше адаптуються до нестерильних умов під час перенесення їх у ґрунт без використання первинних адаптаційних субстратів (наприклад, сфагнового моху), та культивування в умовах теплиці за температури 24 °C і 16-годинного фотоперіоду. У подальшому, пристосовані рослини здатні досягати генеративної стадії розвитку та формувати повноцінне насіння.

4.2. Розробка протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*

Для розробки протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* використовували бактеріальні штами C58 та GV3101, генетичні вектори p014 (ген інтересу *nptII*, та маркерний – *sgfp*) та pCB203 (ген інтересу *bar*, маркерний – *uidA*) та 18-добовий калюс пшениці сортів 'Зимоярка' та 'Подільянка'.

Спершу бактеріальну суспензію *A. tumefaciens* штаму C58 (p014) готували за наступною методикою: окремо відібрані колонії *A. tumefaciens* висівали у рідке живильне середовище Himedia M002 з додаванням антибіотиків канаміцину та спектиноміцину у концентрації 100 мг/л. Крім цього у середовище вносили 100 мг/л ацетосирінгону та 0,04 % Silwet L77 (Curtis, Nam 2001). Отриману суспензію культивували протягом ночі на ротаційному шейкері. Наступного ранку вимірювали її оптичну щільність, яку доводили до $OD_{600} = 0,2$. Експланти витримували в бактеріальній суспензії протягом 5–10 хв. Після цього просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МСК, культивували в умовах темряви за температури 27 °C протягом 48 год. Пізніше калюс переносили на середовище для регенерації МСР4, доповнене 100 мг/л

канаміцину та 400 тиментину та культивували за температури 24 °C до утворення регенерантів.

Одним із факторів, які впливають на ефективність трансформації є щільність бактеріальної суспензії (OD_{600}). Оптимальна кількість бактеріальних клітин в 1 мл суспензії для різних штамів, культур та генотипів знаходиться в діапазоні від 0,2 до 2 оптичних одиниць (Rashid et al., 2010; Ziemienowicz, 2013; Бавол та ін., 2015). В наших експериментах використання бактеріальної суспензії з $OD_{600} = 0,2$ оп.од. під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації не дало змоги отримати трансформанти, отже, описана вище методика приготування бактеріальної суспензії виявилася неефективною.

В подальшому використовували методику Сидорова (Sidorov, Duncan, 2009) з певними модифікаціями: окремі колонії агробактерій переносили з агаризованого середовища LB у 25 мл рідкого живильного середовища LB, доповненого 100 мг/л канаміцину та спектиноміцину (C58); 100 мг/л карбеніциліну, 25 мг/л гентоміцину, 50 мг/л рифампіцину (GV3101). Отриману суспензію культивували протягом ночі на ротаційному шейкері при 200 об/хв і температурі 26 °C. Наступного ранку бактеріальну суспензію розводили 1:5 свіжим середовищем LB та центрифугували при 4000 об/хв протягом 15 хв. Зливши супернатант, клітини ресуспендували в 10 мл індукційного середовища, яке містило ацетосирінгон та відповідні антибіотики (залежно від штаму, який використовували). Оптичну щільність доводили до $OD_{600} = 0,2$ оп.од. Отриману суспензію *A. tumefaciens* повторно культивували протягом ночі на ротаційному шейкері при 200 об/хв і температурі 26 °C. Нічну культуру агробактерій осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв і ресуспендували в 6–10 мл інокуляційного середовища, доповненого ацетосирінгоном. Оптичну щільність бактеріальної суспензії доводили до $OD_{600} = 0,4$ оп.од.

Гу із співавт. (Hu et al., 2003) показано, що найвища частота трансформації пшениці (4,4 %) за використання штаму *A. tumefaciens* CP4

спостерігалася при $OD_{600} = 0,5$ оп.од. За даними Рашіда і співавт. (Rashid et al., 2010) при даній оптичній щільності бактеріальної суспензії штаму ЕНА101 ефективність отримання біотехнологічних рослин становила 12,5 %. У випадку $OD_{600} = 0,75$ та 1,0 оп.од. частота трансформації становила 4,07 % та 0,0 % відповідно (Rashid et al., 2010). При збільшенні значення оптичної щільності спостерігається надмірний ріст *A. tumefaciens*, в результаті чого відбувається загибель експлантів. Найвищу частоту трансформації отримали Саркер та Бісвос (Sarker, Biswas 2002) за використання штаму ЕНА105 та $OD_{600} = 0,75$ оп.од., а також Ванг із співавт. (Wang et al., 2002) при використанні бактеріальної суспензій з $OD_{600} = 1,0$ оп.од.

У нашій роботі використовували оптичні щільності клітин бактеріальної суспензії, які становили 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0 оп.од. При використанні суспензії агробактерій з оптичною щільністю $OD_{600} = 0,2$ оп.од. утворювалась велика кількість морфогенних зон, однак з такого калюсу трансформантів не отримано. За використання $OD_{600} = 0,6$ оп.од. спостерігалась бактеріальна контамінація зразків калюсу до 50 %. При збільшенні концентрації агробактерій до $OD_{600} = 0,8$ оп.од. та 1,0 оп.од. у частини калюсів (близько 75–80 %) спостерігали некроз та загибель протягом тижня культивування на середовищі для регенерації. Інша частина експлантів характеризувалася сильною бактеріальною контамінацією та невдовзі гинула.

Нами показано, що найефективнішою оптичною щільністю клітин *A. tumefaciens* для забезпечення нормального протікання морфогенетичних процесів у калюсів, отриманих із апікальних меристем пшениці сортів ‘Зимоярка’ та ‘Подільська’, є $OD_{600} = 0,4$ оп.од. При даному значенні OD_{600} спостерігається максимальне утворення морфогенних осередків (до 50,7 %) та відсутність вираженої бактеріальної контамінації.

В процесі *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації більшості культур для індукції *vir* активності рекомендовано використовувати хімічні речовини, такі як ацетосирінгон. Показано, що за його відсутності спостерігається досить низький рівень експресії гена *uidA*, а також

відсутність регенерації стабільних трансформантів у рису та ячменю (Zhao, 2001; Kumlehn et al., 2006; Orabode, 2006). Однак, деякі експланти в однодольних можуть бути успішно трансформовані без допомоги зовнішніх хімічних індукторів. Наприклад, меристеми цукрової тростини за попередньої обробки антинекротичною сумішшю (аскорбінова кислота, цистеїн та нітрат срібла) (Enriquez-Obregon et al., 1999), незрілі зародки та ембріогенний калюс пшениці (Cheng et al., 2003) можуть бути ефективно трансформовані в умовах підсушування. В наших дослідках з метою підсилення ефективності трансформації пшениці за допомогою агробактерій використовували ацетосирінгон у концентрації 200 мкМ як зазначено в роботі Патнаїка (Patnaik, 2006).

Селекційна система – один із найбільш важливих факторів, що впливають на ефективність трансформації. Застосування селективних агентів може не лише негативно впливати на нетрансформовані клітини, а й пригнічувати регенерацію трансформованих. Як правило, для селекції рослин, трансформованих геном *nptII*, ефективно використовується антибіотик канаміцин. Однак, для деяких видів спостерігається негативний вплив даного антибіотика на регенерацію, що значно знижує частоту трансформації. Одним із шляхів вирішення даної проблеми є зміна умов селекції або заміна селективного гена *nptII* на інший селективний ген (Panathula et al., 2014; Nitovska et al., 2015).

В якості селективного агента для ефективного відбору трансформантів за використання генетичної конструкції p014 використовували антибіотики канаміцин та паромоміцин у концентрації 100 мг/л, а для pCB203 – фосфінотрицин (5 мг/л). Сформовані 18-добові калюси сорту ‘Зимоярка’ (2790 шт) та ‘Подільська’ (1155 шт) витримували у бактеріальній суспензії протягом 15 хв, просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище для спільного культивування, яке тривало 48 год у термостаті за температури 27 °C. Після кокультивування з *A. tumefaciens* штаму C58 калюс переносили на живильне регенераційне середовище MCR4,

доповнене 100 мг/л канаміцину та культивували за температури 24 °C і 16-годинного фотоперіоду протягом 60-ти днів. Формування первинних меристематичних осередків починалося на 15-ту добу, однак частина калюсів залишалася неморфогенною з чітко вираженими процесами некрозу. Частота утворення морфогенного калюсу на середовищі з канаміцином в середньому становила $44,9 \pm 2,9$ % у сорту ‘Зимоярка’ та $40,3 \pm 1,3$ % – у сорту ‘Подільська’, а частота регенерації становила $18,8 \pm 0,8$ % та $16,5 \pm 1,4$ % відповідно (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

**Вплив селективних агентів на частоту трансформації пшениці
A. tumefaciens штаму C58**

Сорт	Зимоярка		Подільська	
Селективний агент	канаміцин	паромоміцин	канаміцин	паромоміцин
Частота утворення морфогенного калюсу, %	$44,9 \pm 2,9$	$51,3 \pm 2,5$	$40,3 \pm 1,3$	$48,5 \pm 2,1$
Частота регенерації, %	$18,8 \pm 0,8$	$20 \pm 1,7$	$16,5 \pm 1,4$	$18,5 \pm 1,3$
Частота трансформації, %	-	2,4	-	2,7

Примітка: $p \leq 0,05$.

Частина утворених пагонів характеризувалася відсутністю хлорофілу, нездатністю формувати кореневу систему та невдовзі гинула. Інша частина регенерантів містила хлорофіл, однак при перенесенні на живильне середовище для вкорінення протягом 7 діб поступово знебарвлювалася, не утворюючи коренів. Як відомо, корені дуже чутливі до антибіотиків (Dgarer et al., 1988), однак показано, що при знижених концентраціях канаміцину (до 50 мг/л) у деяких рослин можна отримати значну кількість пагонів та коренів (Lipp, 1993).

Подальший відбір трансформантів проводили з використанням аміноглікозидного антибіотика паромоміцину. Загалом було оброблено бактеріальною суспензією та висаджено на селективне регенераційне середовище 945 шт первинних калюсів пшениці сорту ‘Зимоярка’ та 725 шт – сорту ‘Подільська’. Культивування проводили за температури 24 °C та 16-

годинного фотоперіоду протягом 60-ти діб. За використання паромоміцину в якості селективного агента поява меристематичних осередків розпочиналася значно раніше (5–10-й день культивування), ніж у випадку використання канаміцину. Окрім цього частота утворення морфогенного калюсу була вищою – $48,5 \pm 2,1$ % ('Подольнка') та $51,3 \pm 2,5$ % ('Зимоярка'). Після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на живильному середовищі для регенерації МСР4, яке містило паромоміцин (100 мг/л), загалом отримано 323 регенеранти (рис. 4.9), з яких 134 – сорту 'Подольнка' та 189 – 'Зимоярка'.

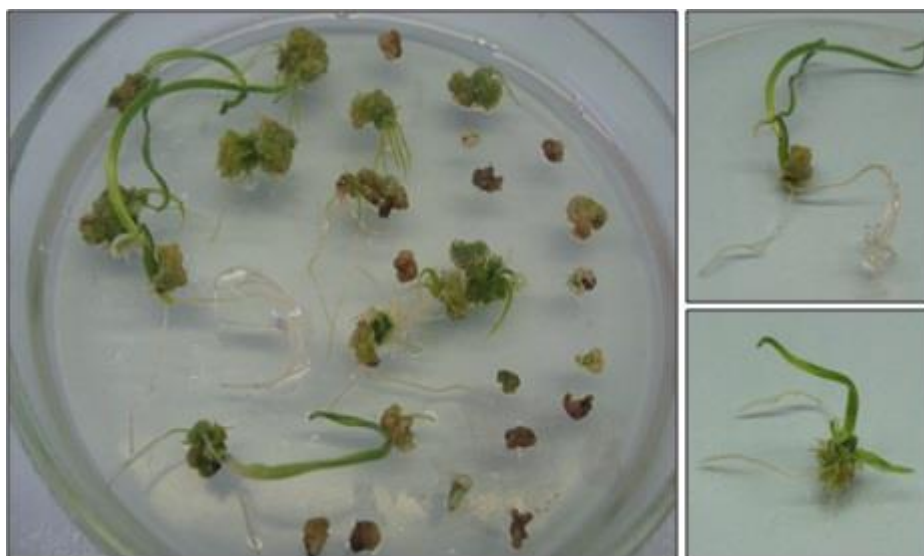


Рис. 4.9. Регенеранти пшениці, отримані після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на селективному середовищі, що містить 100 мг/л паромоміцину.

Згодом, частина пагонів також знебарвлювалась та не формувала кореневої системи. Відібрані після первинної селекції регенеранти (29 шт – сорту 'Подольнка' та 32 шт – сорту 'Зимоярка') переносили на середовище для вкорінення МСР2.

З метою підтвердження наявності послідовності трансгена *nptII* в регенерованих пагонах проводили аналіз за допомогою ПЛР. Згідно з його результатами позитивний сигнал наявності послідовності гена *nptII* – амплікон довжиною 647 п.н. (рис. 4.10) – виявлено у 20 рослин-регенерантів

пшениці сорту ‘Подільська’ та 23 – сорту ‘Зимовка’, що становить 2,7 % та 2,4 % від загальної кількості трансформованих експлантів відповідно.

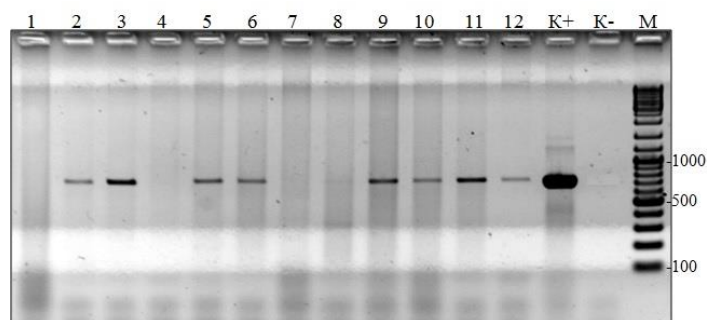


Рис. 4.10. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *nptII*. Доріжки 1–12 – досліджувані зразки, K+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K- – негативний контроль – ТЕ буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Оскільки генетична конструкція p014, якою трансформували експланти, містить маркерний ген *sgfp*, то за допомогою ПЛР було проведено визначення присутності послідовності даного трансгена в рослинах, у яких попередньо виявили наявність гена *nptII*. За результатами аналізу послідовностей синтетичного гена зеленого флуоресцентного білка у зразках не виявлено (рис. 4.11). Це свідчить про те, що під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації генетична конструкція була перенесена не цілісно – вбудувався лише ген *nptII*.

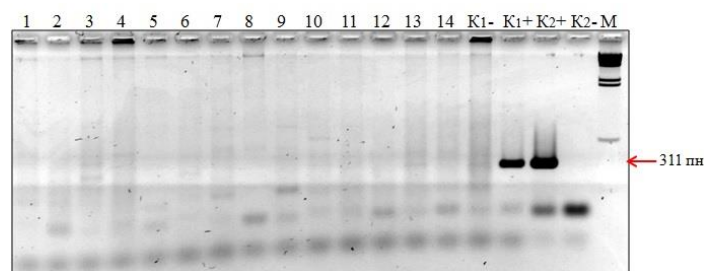


Рис. 4.11. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до *sgfp*. Доріжки 1–14 – досліджувані зразки, K1- – негативний контроль – ДНК нетрансформованої рослини пшениці; K1+ – позитивний контроль – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* штаму C58 з генетичною конструкцією p014; K2+ – позитивний контроль – ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014; K2- – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

З метою виключення бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме *Vir C*. Довжина очікуваного амплікона 720 п.н. (рис. 4.12).

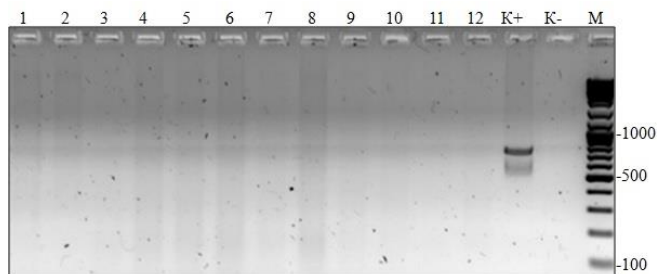


Рис. 4.12. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *Vir C*. Доріжки 1–12 – досліджувані зразки, K⁺ – позитивний контроль, агробактеріальна ДНК штаму C58, K⁻ – негативний контроль, TE буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Спираючись на отримані результати, можна стверджувати, що інтеграція Т-ДНК генетичної конструкції р014 відбулася частково, оскільки послідовностей трансгена *sgfp* у досліджуваних зразках не виявлено.

4.3. Отримання трансгенних рослин пшениці м'якої, стійких до фосфінотрицину (гербіцид Баста®)

Для трансформації, опосередкованої *A. tumefaciens*, використовували генетичний вектор рCB203. Він містить гени *bar* та *uidA* під контролем убіквітинового промотора. Генетичну трансформацію проводили за допомогою штаму *A. tumefaciens* GV3101.

Бактеріальною суспензією було оброблено 960 4–6-добових калюсів. Калюс отримували з незрілих зародків пшениці сорту 'Зимоярка' (рис. 4.13). Після спільного культивування (15 хв) із суспензією *A. tumefaciens* штаму GV3101 калюси просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на середовище МСК, культивували в умовах темряви за температури 27 °С протягом 48 год. Пізніше калюс переносили на середовище для регенерації МСР4, яке містило 5 мг/л фосфінотрицину, та

культивували за температури 24 °C та 16-годинного фотоперіоду протягом 60-ти діб.

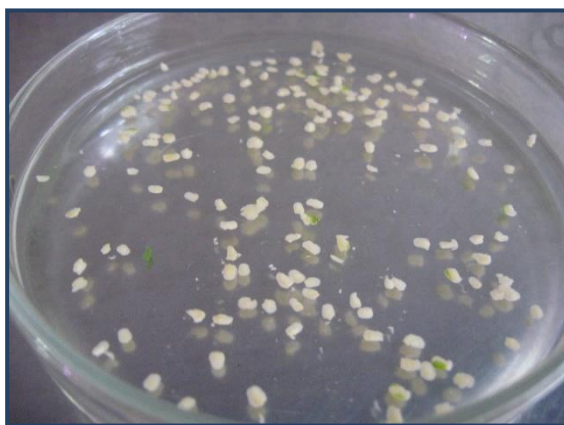


Рис. 4.13. Незрілі зародки пшениці *T. aestivum* на живильному середовищі одразу після виділення.

Формування первинних меристематичних осередків розпочиналося на 5-ту добу. Відсоток утворення морфогенного калюсу в середньому становив $68,9 \pm 2,5$ %. На 10-у добу культивування починали з'являтися пагони (рис. 4.14).

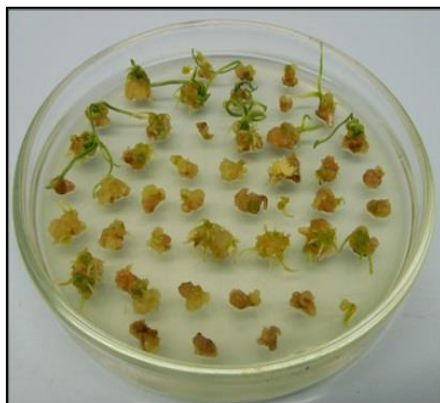


Рис. 4.14. Регенерація пшениці сорту 'Зимоярка' після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину.

Після первинної селекції було отримано 174 регенерованих пагони, які переносили на середовище для вкорінення MCR2. Частота регенерації становила $18,1 \pm 0,6$ %. Частина регенерантів поступово втрачала зелене забарвлення та не утворювала коренів.

З метою підтвердження наявності послідовності трансгена *bar* в регенерованих пагонах проводили аналіз за допомогою ПЛР. За його результатами позитивний сигнал присутності послідовності гена – амплікон довжиною 405 п.н. (рис. 4.15) – виявлено у 12 рослин-регенерантів пшениці, що становить 1,2 % від загальної кількості оброблених бактеріальною суспензією експлантів.

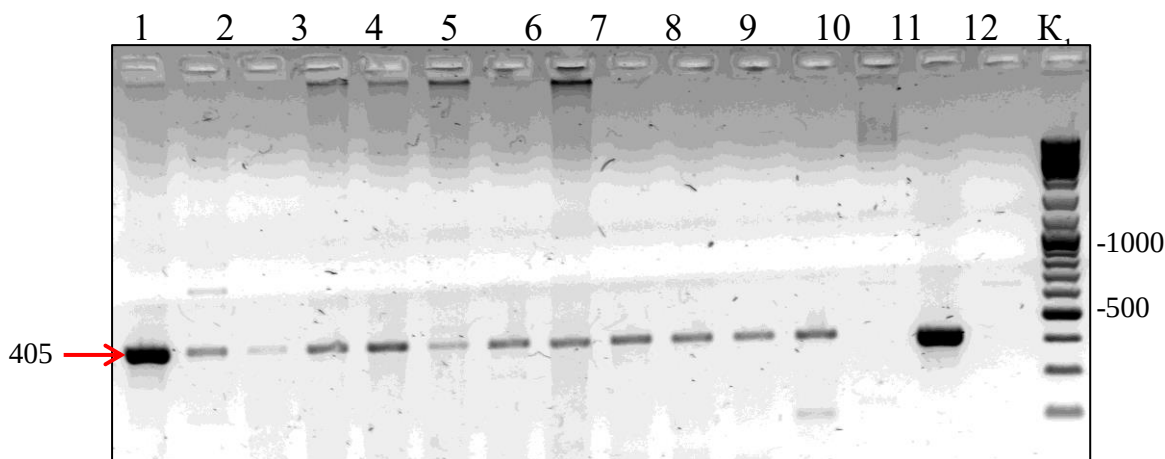


Рис. 4.15. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *bar*. Доріжки 1–12 – досліджувані зразки № 2–13; K₁ – ДНК нетрансформованої пшениці сорту ‘Зимоярка’ у якості негативного контролю; K₂ – позитивний контроль, ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією pCB203; K₀ – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для того, щоб виключити можливість бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності, а саме *Vir C* (рис. 4.16). Результати аналізу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції свідчать про відсутність бактерії в рослинних зразках та дозволяють стверджувати, що відбулася інтеграція трансгена в рослинний геном.

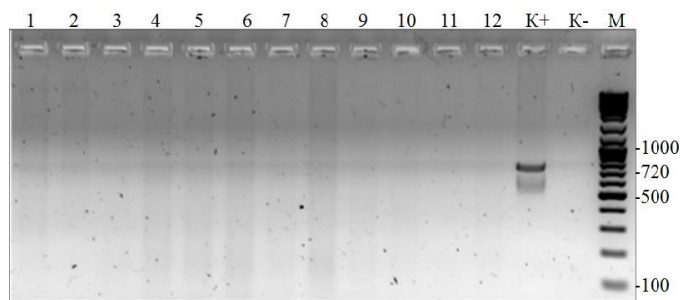


Рис. 4.16. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *Vir C*. Доріжки 1–12 – досліджувані зразки № 2–13, K+ – позитивний контроль – агробактеріальна ДНК штаму GV3101, K- – негативний контроль – ТЕ буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Також була проведена трансформація 18-добового калюсу апікального походження обох сортів ('Подільянка' та 'Зимьярка'). У дослідження було залучено 1750 шт калюсів сорту 'Подільянка' та 2145 шт – сорту 'Зимьярка'. Частота трансформації калюсу пшениці апікального походження за використання *A. tumefaciens* штамів C58 та GV3101 у сорту 'Зимьярка' становила відповідно 2,7 та 1,6 % , а у сорту 'Подільянка' – 1,6 та 1,8 % (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Ефективність трансформації калюсу пшениці апікального походження за використання *A. tumefaciens* штамів C58 та GV3101

Штам <i>A. tumefaciens</i>	C58 (p014)		GV3101 (pCB203)	
Сорт	Зимьярка	Подільянка	Зимьярка	Подільянка
Частота утворення морфогенного калюсу, %	51,3±2,5	48,5±2,1	55,7±1,6	51,3±1,5
Частота регенерації, %	18,8±0,8	16,5±1,4	19,2±0,7	17±1,1
Частота трансформації, %	2,7	2,4	1,6	1,8

Аналіз регенерантів на наявність генетичної послідовності гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) проводили за допомогою ПЛР та специфічних праймерів (рис. 4.17). Використовуючи калюс апікального походження загалом отримано 31 трансгенну рослину пшениці сорту 'Подільянка' та 34 – сорту 'Зимьярка'.

Таким чином, у результаті проведеної роботи удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин пшениці. Показано, що найбільш ефективною є оптична щільність клітин агробактеріальної суспензії 0,4 оптичні одиниці. Заміна антибіотика канаміцину на паромоміцин, який характеризується м'якшою дією на рослинний організм, сприяла отриманню трансгенних рослин. За використання паромоміцину як селективного агента після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації нами отримано 23 трансформанти сорту 'Зимьярка' та 20 – сорту 'Подільянка', відповідно частота трансформації становила 2,7 % та 2,4 %.

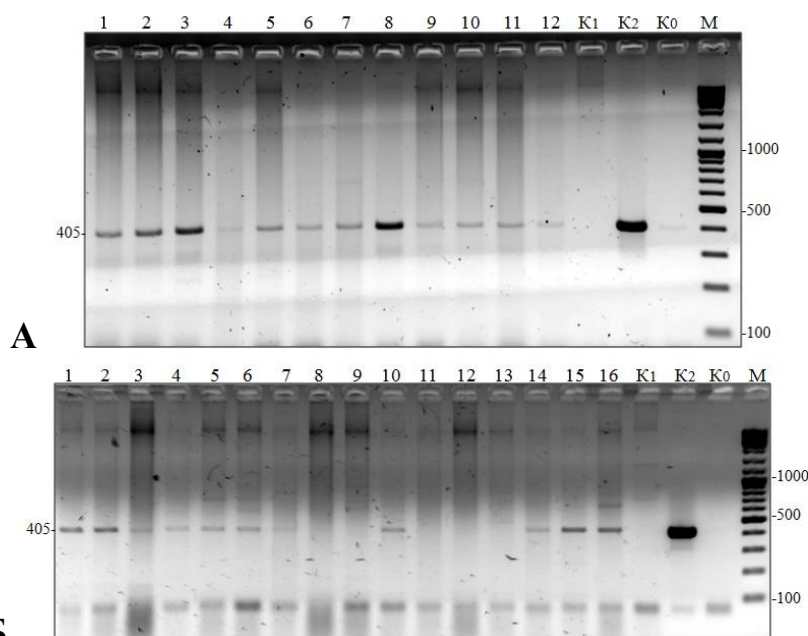


Рис. 4.17. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *bar*. Доріжки 1–12 – досліджувані зразки № 7–18 сорту ‘Зимоярка’ (А), 1–16 – досліджувані зразки № 18–34 сорту ‘Подлянка’ (Б); К₁ – ДНК нетрансформованої пшениці сорту ‘Зимоярка’ (А) та сорту ‘Подлянка’ (Б) у якості негативного контролю; К₂ – позитивний контроль, ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією pCB203; К₀ – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

За використання вектора pCB203 з калюсу, отриманого з незрілих зародків, одержано 12 трансформованих рослин пшениці сорту ‘Зимоярка’ – частота трансформації становить 1,2 %. З калюсу апікального походження отримано 34 лінії сорту ‘Зимоярка’ (частота трансформації 1,6 %) та 31 – сорту ‘Подлянка’ (частота трансформації 1,8 %). Трансгенна природа всіх отриманих рослин підтверджена за допомогою методу ПЛР за використання специфічних праймерів.

4.4. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація пшениці м’якої методом *in planta*

На даний час все більш привабливим стає метод *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, оскільки він дозволяє уникнути використання культури тканин *in vitro*, тим самим зменшуючи собівартість та довготривалість експериментів, та соматичної мінливості, яка

зустрічається під час генетичної трансформації і регенерації *in vitro* (Чумаков, Моисеева, 2012; Subramanyam et al., 2013). Показано, що частота трансформації рису та пшениці м'якої за допомогою даного методу є значно вищою порівняно з іншими методами генетичної трансформації (Supartana et al., 2006; Воронова та ін., 2015, Гончарук та ін., 2015). Метод отримання біотехнологічних рослин *in planta* успішно використовується для різних сільськогосподарських культур, включаючи овочеві (редис, томати і перець) (Yasmeen et al., 2009; Kumar et al., 2009) та злаки (пшениця, кукурудза, рис) (Supartana et al., 2006; Chumakov et al., 2006; Mamontova, 2013; Moiseeva, 2014).

Ефективність трансформації за допомогою цього методу залежить від ряду специфічних факторів. Одними із таких для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* виступають умови навколишнього середовища, які включають температурний режим, вологість повітря, наявність чи відсутність опадів. На ефективність трансформації за допомогою даного методу часто впливає час контакту тканин рослини з *Agrobacterium* та умови приготування бактеріальної суспензії.

4.4.1. Оптимізація методики *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* пшениці *T. aestivum* сорту 'Подільнка'

Для досліджень використовували штам C58 *A. tumefaciens* з генетичною конструкцією p014, до складу Т-ДНК якої входять гени *nptII* і *sgfp*. Бактерію вирощували у рідкому середовищі Himedia M002 (Supartana et al., 2006) з відповідними антибіотиками (спектиноміцин 50 мг/л та канаміцин 100 мг/л) на шейкері протягом 16 год. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 10 хв і ресуспендували у стерильній дистильованій воді до оптичної щільності $OD_{600} = 1,0$ оп.од. (Supartana et al., 2006; Agarwal et al., 2009; Zale et al., 2009; Чумаков,

Моисеева, 2012). До суспензії бактерій додавали 100 мкМ ацетосирінгону та 0,05 % Silvet L77 (Curtis, 2001), рН доводили до 4,0.

Колоси кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією. Запилення проводили пилком, отриманим з іншого колосу тієї ж рослини. Середня довжина колоса становила 5,9 см.

Після завершення вегетаційного періоду отримано 293 насінини з 620 прокастрованих та оброблених агробактеріальною суспензією колосків. Таким чином, середня зав'язуваність насіння для оброблених бактеріальною суспензією колосів становила $46,4 \pm 2,4$ %. Отримане насіння відзначалося виповненістю і задовільним зовнішнім виглядом (рис. 4.18).



Рис. 4.18. Типовий колос (ліворуч) та насіння (праворуч), отримане після обробки агробактеріальною суспензією *in planta*.

Все отримане насіння T_1 висівали у ґрунт: частину зерен T_1 висаджували у вегетаційні посудини і культивували в умовах теплиці за температури 22°C і 16-годинного фотоперіоду, частину вирощували в умовах мікроділянкового дослідження. Після того, як рослини T_1 досягли фази двох листків, частину одного з листків зрізали для проведення ПЛР-аналізу.

Серед проаналізованих 175 рослин T_1 тільки у дев'яти (5,1 %) виявлено позитивний сигнал наявності послідовності гена *nptII* – амплікон довжиною 647 п.н. (рис. 4.19). За допомогою ПЛР проводили визначення наявності послідовностей синтетичного гена зеленого флуоресцентного білка (*sgfp*) у відібраних рослинах, в яких попередньо виявили присутність *nptII* трансгена. У досліджуваних 9-ти зразків присутність послідовності гену *sgfp* – амплікон

довжиною 311 п.н. – виявлена тільки у 4-х, що становить 2,3 % від протестованих 175 рослин (рис. 4.20).

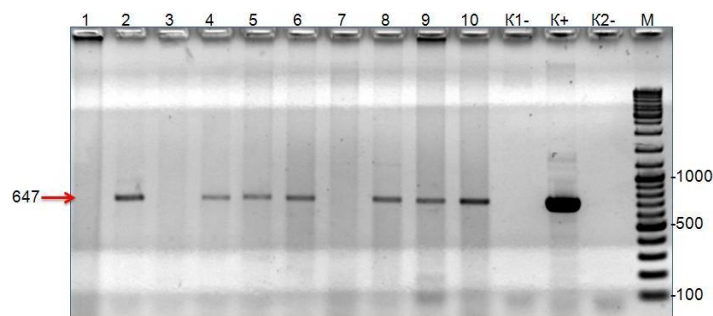


Рис. 4.19. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *nptII*. Доріжки 1–10 – досліджувані зразки, K1- – ДНК нетрансформованої пшениці сорту ‘Подільська’ у якості негативного контролю, K+ – позитивний контроль, ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014, K2- – негативний контроль, ТЕ буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

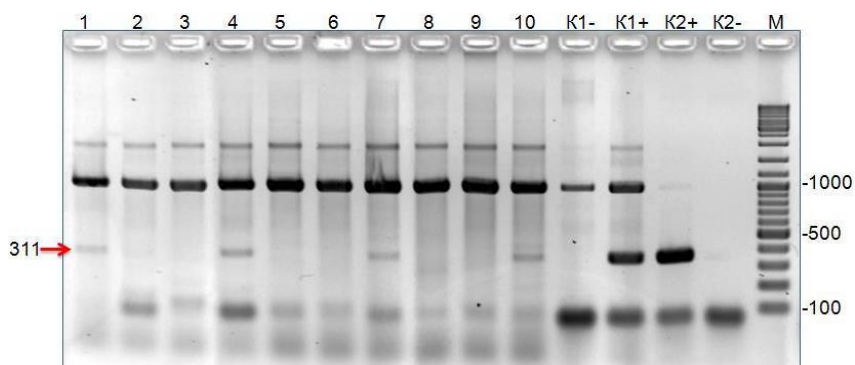


Рис. 4.20. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *sgfp*. Доріжки 1–10 – досліджувані зразки; K1- – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини пшениці; K1+ – позитивний контроль, ДНК пшениці, яка містить послідовність трансгена *sgfp*; K2+ – позитивний контроль, ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014; K2- – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для досліджень крім штаму C58 використовували штам GV3101 *A. tumefaciens* з генетичною конструкцією pCB203, Т-ДНК якої включала послідовності генів *uidA* та *bar*. Бактеріальну суспензію для генетичної трансформації *in planta* отримували за методикою Сидорова (Sidorov, Duncan, 2009) з певними модифікаціями: з інокуляційного середовища повністю виключали сахарозу, оскільки за нашими спостереженнями 2013–2014 рр., а також спираючись на дослідження Гончарука та співавт. (Гончарук та ін., 2015), показано, що сахароза є хорошим субстратом для

розвитку сапрофітної мікрофлори, що заважає нормальному процесу запилення/запліднення та знижує ефективність процесу трансформації. Оптична щільність використаної суспензії була $OD_{600} = 1,0$ оп.од.

Після застосування модифікованого інокуляційного середовища під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* все отримане насіння (200 зерен) висівали в ґрунт. Для аналізу на наявність трансгенів було відібрано 145 рослинних зразків (частина листка рослини). З них наявність генетичної послідовності трансгена *nptII* детектовано у 30 зразках (рис. 4.21). Частота трансформації становить 20,7 % від загальної кількості проаналізованих зразків.

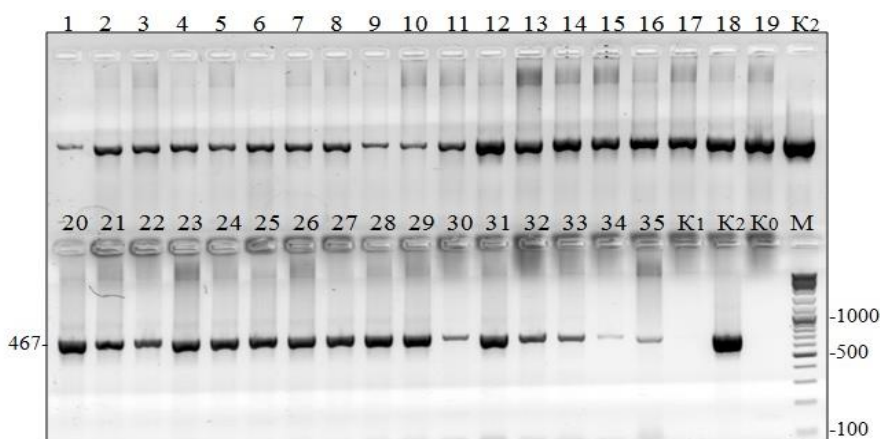


Рис. 4.21. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *nptII*. Доріжки 1–35 – досліджувані зразки; K1 – ДНК нетрансформованої пшениці сорту ‘Подільська’ у якості негативного контролю; K2 – позитивний контроль, ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією p014; K0 – негативний контроль, TE буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для того, щоб виключити можливість бактеріальної контамінації проводили детекцію генів вірулентності агробактерій, а саме *Vir C* (рис. 4.22).

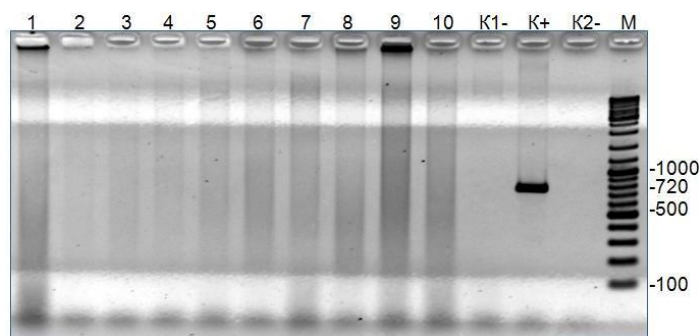


Рис. 4.22. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *Vir C*. Доріжки 1–10 – досліджувані зразки; K1- – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини пшениці; K+ – позитивний контроль, ДНК агробактеріального штаму C58; K2- – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Результати полімеразної ланцюгової реакції (рис. 4.22) свідчать про відсутність бактеріального зараження трансформантів за умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та дозволяють стверджувати, що Т-ДНК вбудувалась в рослинний геном.

За допомогою методу *in planta* одержано 9 рослин пшениці, трансгенних за обома генами – *nptII* та *sgfp*. Частота трансформації становила 2,3 %. Після застосування модифікованого середовища для інокуляції отримано 30 рослин *T. aestivum*, трансгенних за геном *nptII*. Частота трансформації – 20,7 %. Таким чином, оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та доведено можливість отримання трансформантів пшениці *T. aestivum* сорту вітчизняної селекції ‘Подільянка’ методом *in planta*.

4.5. Отримання біотехнологічних рослин пшениці м’якої сорту ‘Подільянка’, стійких до фосфінотрицину, методом *in planta*

Одним із важливих факторів, які впливають на процес трансформації *in planta* та його ефективність є температура навколишнього середовища (Tempe et al., 1977; Moiseeva et al., 2014; Воронова та ін., 2015). Для трансформації використовували рослини пшениці сорту ‘Подільянка’.

Проведено 4 серії експериментів за різної температури та вологості навколишнього середовища:

- 1) $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, вологість 44 %;
- 2) $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, вологість 69 %;
- 3) $t = 16\text{ }^{\circ}\text{C}$, вологість 79 %, дощ;
- 4) $t = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, вологість 41 %.

Відібрані колоси (112 шт) кастрували та обробляли агробактеріальною суспензією відповідно до оптимізованої методики. Середня довжина колоса становила 6,3 см. У дослідженні використовували *A. tumefaciens* штаму GV3101, який містив генетичну конструкцію pCB203. Для запилення у варіантах № 2–4 використовували пилок з іншого колоса тієї ж рослини, а рослини у варіанті № 1 запилювали пилом високопродуктивного сорту ‘Сонечко’ через відсутність квітучих колосів сорту ‘Подольнка’.

Після періоду вегетації загалом зібрано 89 колосів та отримано 348 зернівок (табл. 4.8). Максимальну кількість зернівок (191 шт), яка відповідає найбільшому відсотку зав’язуваності ($40,6 \pm 0,7\%$), одержано з рослин варіанта № 1. В даному випадку умови навколишнього середовища були наближеними до оптимальних. Контрольними були колоси, оброблені середовищем для інокуляції та запилені пилом сорту ‘Сонечко’. Зав’язуваність у контролі була $16,5 \pm 0,9\%$.

У варіанті № 3 отримано найменшу кількість зерен (42 шт разом з контролем), що відповідає зав’язуваності $8,1 \pm 1,6\%$. Погодні умови для даного дослідження характеризувалися низькою температурою ($t = 16\text{ }^{\circ}\text{C}$) та високою вологістю. Для запилення використовували пилок цього ж сорту. У варіанті № 4, де $t = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, зав’язуваність була значно більшою порівняно з варіантом № 3. Таким чином, зниження температури у поєднанні з опадами більш негативно впливає на запилення, ніж її підвищення.

З метою визначення залежності ефективності трансформації від умов навколишнього середовища все отримане насіння висівали у ґрунт для подальшого аналізу.

Таблиця 4.8

**Залежність зав'язуваності насіння сорту 'Подольська' від умов
навколишнього середовища**

Варіант	1		2		3		4	
Генетична конструкція	рСВ 203	Конт роль	рСВ 203	Конт роль	рСВ 203	Конт роль	рСВ 203	Конт роль
Кількість зернівок, шт	191	21	92	14	42	0	23	80
Довжина колоса, см	6,8± 0,5	7,6± 0,2	6,8± 0,3	7,5± 0,6	6,4± 0,5	7,5± 0,4	5,4± 0,3	6,4± 0,6
% зав'язуванос ті насіння	40,6± 0,7	16,5± 0,9	37,2± 0,5	11,5± 1,1	8,1± 1,6	0	32,9± 1,3	27,3± 1,5

З рослин, які вийшли у фазу двох листків, зрізали частину листка для виділення загальної ДНК та виявлення послідовності трансгена *bar*. Загалом було відібрано 545 зразків. За результатами ПЛР-аналізу наявність генетичної послідовності детектовано у 85 зразках (рис. 4.23). Ефективність трансформації за трансгеном *bar* становила 15,6 % від загальної кількості відібраних зразків.

Отримані нами дані свідчать, що температурний режим $t \approx 24^\circ\text{C}$ (варіант № 1) та помірна вологість повітря (44 %) забезпечує отримання максимальної кількості (7,3 %) трансформантів. За тієї ж температури, проте вищої вологості отримано меншу їх кількість (5,5 %). При зниженні температури до 16–18 °C відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. Тому, у варіанті № 3 спостерігався найменший відсоток трансформації (0,5 %). Крім цього, зменшення ефективності отримання трансгенних рослин у даному варіанті, на нашу думку, було спричинене опадами. При підвищенні температури до 27 °C (варіант № 4) частота появи трансгенних за геном *bar* рослин дещо знижується і становить 2 %. Ймовірно це пов'язано із утворенням *Vir*-залежних агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК, і для яких високі температурні показники є критичними (Moiseeva et al., 2014).

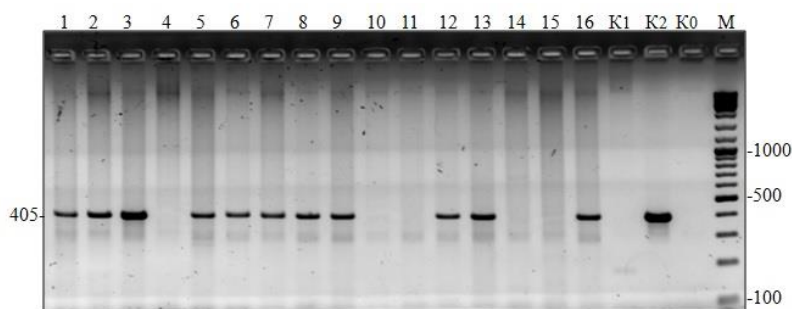


Рис. 4.23. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *bar*. Доріжки 1–16 – досліджувані зразки; K₁ – ДНК нетрансформованої пшениці сорту ‘Зимоярка’ у якості негативного контролю; K₂ – позитивний контроль, ДНК *N. tabacum*, трансформованого конструкцією pCB203; K₀ – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Зразки, у яких виявили присутність послідовності трансгена *bar* перевіряли на наявність агробактерій шляхом детекції генів вірулентності (*VirC*) (рис. 4.24). Результати аналізу свідчать про відсутність агробактеріального зараження у досліджуваних зразках.

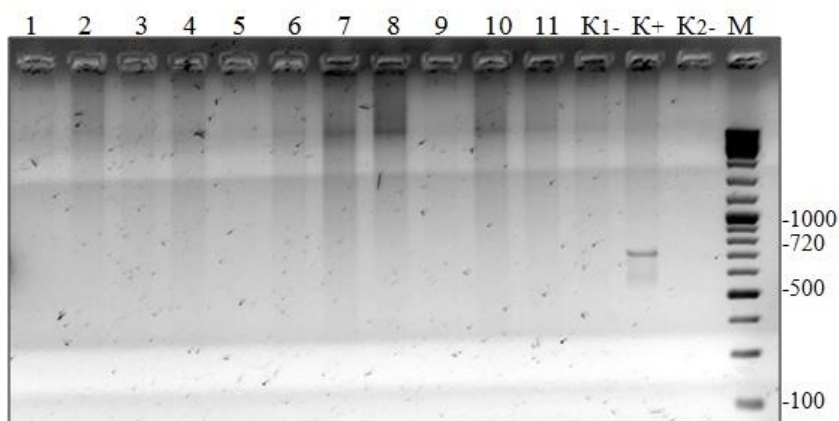


Рис. 4.24. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК пшениці з праймерами до гена *Vir C*. Доріжки 1–11 – досліджувані зразки; K1- – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини пшениці; K+ – позитивний контроль, ДНК агробактеріального штаму GV3101; K2- – негативний контроль, ТЕ буфер, М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Отже, нами підтверджено висновок Гончарука, Бавола і Дубровної (Гончарук та ін., 2015) про негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*. Так, за її наявності в інокуляційному середовищі частота трансформації за генами *nptII* та *sgfp* становила 2,3 %. Використовуючи методику генетичної

трансформації за Сидоровим (Sidorov, Dunkan, 2009) з певними модифікаціями (відсутність в середовищі для інокуляції сахарози) отримано трансформанти за генами *bar* (15,6 %) та *nptII* (20,7 %). Наявності послідовності трансгена *sgfp* у відібраних зразках не виявлено, що свідчить про неповне вбудування генетичної конструкції.

Встановлено, що температурний режим $t \approx 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ та помірна вологість повітря (44 %) під час *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* сприяє зав'язуваності насіння та підвищує можливість отримання трансформантів. Зниження температури навколишнього середовища або її підвищення негативно впливає на частоту трансформації. Таким чином, доведена можливість отримання трансгенних рослин пшениці сорту 'Подільська' за допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*.

4.6. Дослідження експресії трансгенів у рослинах пшениці *T. aestivum*

Дослідження експресії трансгенів *nptII* та *bar* у рослинах пшениці сорту 'Подільська' здійснювали на рівні транскрипції. Для цього проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією. Загальну РНК виділяли з листків трансгенних рослин та обробляли дезоксирибонуклеазою I, вільною від рибонуклеаз відповідно до методики (Вох, 2011). Виділена РНК трансгенних рослин пшениці була використана для синтезу кДНК. З метою виявлення домішок ДНК в препаратах РНК, проводили ПЛР-аналіз з використанням відповідних праймерів, специфічних до референтного гена пшениці TaG3PDH (рис. 4.25), а також генів *nptII* (рис. 4.26) та *bar* (рис. 4.27). В якості позитивного контролю використовували рослини тютюну *N. tabacum*, трансформовані векторами p014 та pCB203.

Відсутність сигналу на доріжках 2, 4, 6 та 8 (рис. 4.25; 4.26) та 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 та 16 (рис. 4.27) вказує на чистоту РНК-препаратів. ПЛР-аналіз

синтезованої в ході реакції зворотної транскрипції кДНК показав наявність експресії гена *nptII* у всіх зразках (рис. 4.26), а гена *bar* у 50 % відібраних зразків (рис. 4.27).

Таким чином, підтверджено експресію генів *nptII* та *bar* в трансгенних рослинах пшениці сорту ‘Подольянка’, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* та *in vitro*.

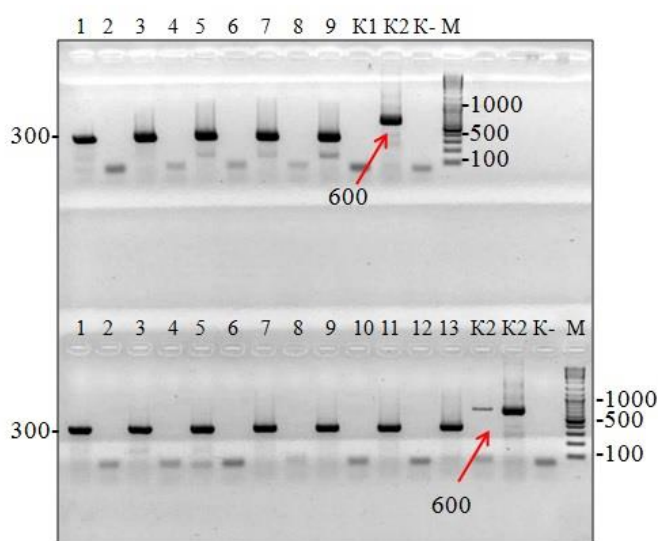


Рис. 4.25. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *TaG3PDH* (кДНК, синтезована за допомогою зворотної транскриптази з мРНК трансгенних рослин пшениці). Доріжки 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 – кДНК трансформованих рослин пшениці сорту ‘Подольянка’; 2, 4, 6, 8, 10, 12 – контроль (ті самі проби кДНК, але без використання зворотної транскриптази); K1 – негативний контроль (кДНК, синтезована з мРНК нетрансгенної рослини); K2 – позитивний контроль (кДНК, синтезована з мРНК трансгенної рослини *N. tabacum*); K- – негативний контроль, ТЕ буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

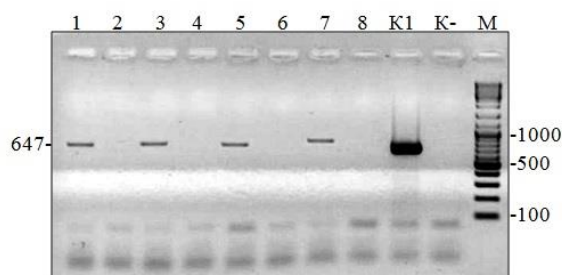


Рис. 4.26. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *nptII* (кДНК, синтезована за допомогою зворотної транскриптази з мРНК трансгенних рослин пшениці). Доріжки 1, 3, 5, 7 – кДНК трансформованих рослин пшениці сорту ‘Подольянка’; 2, 4, 6, 8 – контроль (ті самі проби кДНК, але без використання зворотної транскриптази); K1 – позитивний контроль (кДНК, синтезована з мРНК трансгенної рослини *N. tabacum*, трансформованої плазмідною р014); K- – негативний контроль, ТЕ буфер; M – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

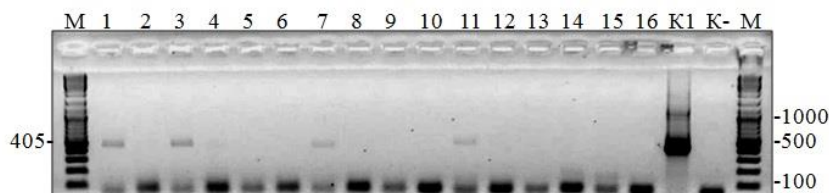


Рис. 4.27. Електрофореграма продуктів ампліфікації гена *bar* (кДНК, синтезована за допомогою зворотної транскриптази з мРНК трансгенних рослин пшениці). Доріжки 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 – кДНК трансформованих рослин пшениці сорту ‘Подільська’; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 – контроль (ті самі проби кДНК, але без використання зворотної транскриптази); K1 – позитивний контроль (кДНК, синтезована з мРНК трансгенної рослини *N. tabacum*, трансформованої плазмідом рСВ203); K- – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Рослини пшениці, які за результатами ПЛР-аналізу містять ген *bar*, досліджували на стійкість до гербіциду Баста® (активна речовина L-фосфінотрицин). Для цього їх обробляли розчином гербіциду у кількості 0,5; 1,0 та 1,5 мг/мл. Рекомендованою виробником є концентрація 1,5 мг/мл. Як контроль використовували нетрансформовані рослини пшениці. Про експресію гена *bar* свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду. За результатами фізіологічного тесту серед проаналізованих рослин стійкість проявляли 25 % від загальної кількості досліджуваних рослин (рис. 4.28).

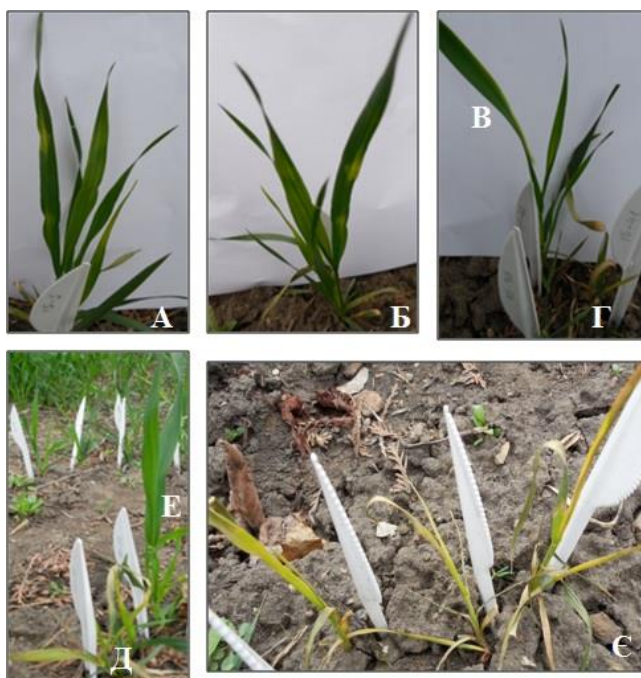


Рис. 4.28. Рослини пшениці сорту ‘Подільська’, оброблені гербіцидом Баста® у концентрації, рекомендованій виробником (1,5 мг/мл): А, Б, В, Е – рослини, стійкі до гербіциду; Г, Д, Є – нетрансформовані рослини пшениці (контроль).

4.7. Аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній та рослин-регенерантів м'якої пшениці

Основні способи отримання генетично модифікованих рослин базуються на перенесенні Т-ДНК у культивовані *in vitro* клітини з наступною регенерацією трансформованих пагонів (Jones et al., 2005). За таких умов може виникати значне число мутацій, відомих під загальною назвою соматональної мінливості (Choi et al., 2000, 2001; Labra et al., 2001). Однак, крім мутагенного ефекту культури тканин, процес трансформації супроводжується додатковим стресом, пов'язаним з механічними пораненнями та культивуванням на селективних середовищах, а також з вбудовуванням використаної генетичної конструкції в геном реципієнта (Enikeev et al., 2008).

Слід зазначити, що мутаційний процес, індукований *Agrobacterium*-опосередкованою трансформацією, є побічним ефектом, який супроводжує створення генетично модифікованих рослин. Дослідження цього процесу є важливим, оскільки інсерція екзогенної ДНК може впливати не тільки на функціонування окремих генів, але й призводити до масштабних хромосомних перебудов та значною мірою змінювати фенотип рослин (Leonard et al., 2003; Flugge et al., 2004; Gaspar et al., 2004). Наслідком перенесення чужорідної ДНК може бути порушення стабільності геному трансформованої рослини, проте даній проблемі приділяється недостатньо уваги, хоча такі дослідження пов'язані не лише з фундаментальними питаннями організації та функціонування геному в цілому, але й з проблемою безпеки споживання трансгенних рослин.

Показано, що інтеграція чужорідної ДНК в ядерний геном може привести як до епігенетичних змін, зокрема зміни рівня метилування ДНК, так і активації транскрипції мобільних генетичних елементів (МГЕ) (Muller et al., 2001). Мацке та співавт. (Matzke et al., 1998, 2000) отримали дані, які переконливо свідчать, що за присутності трансгенів у геномі реципієнта

спостерігається підвищення частоти генетичних перебудов та активація МГЕ. Явище транспозиції являє значний інтерес, оскільки показано його роль як у зміні експресії структурних генів, так й індукції хромосомних аберацій (Kidwell et al., 2000; Todorovska, 2007).

Накопичені на сьогодні дані про мобільні генетичні елементи дозволили розробити способи оцінки поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими повторами, зокрема довгими термінальними ділянками (LTR) ретротранспозонів (Kalendar and Schulman, 2006). IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) – метод ампліфікації геномної ДНК між прилеглими послідовностями ретротранспозонів. Продукт ПЛР ампліфікації ДНК є стабільним генетичним IRAP-маркером. Поліморфізм у даному випадку зумовлений або мутацією в ділянці зв'язування праймера, або унікальним біологічним процесом – ретротранспозицією, в результаті вбудовування ретротранспозону в нову ділянку геномної ДНК без втрати початкової ділянки.

Перевагою застосування методу IRAP-аналізу є одночасний аналіз багатьох анонімних локусів в різних ділянках геному та ідентифікація змін геному, в тому числі викликаних дією стресових чинників. Саме тому поліморфізм спектрів міжретротранспозонних послідовностей може слугувати об'єктивним критерієм мінливості геному.

Натепер у науковій літературі наведено дуже обмежені дані про оцінку трансгенних рослин методом IRAP-аналізу (Wu et al., 2009; Kaya et al., 2013; Schnell et al., 2015; Rao et al., 2016; Yuzbasioglu et al., 2017). Ці результати показують, що генетична трансформація рослин може спричиняти рух ретротранспозонів і викликати ефект транспозиції. У зв'язку з цим, метою нашої роботи був аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній та рослин-регенерантів м'якої пшениці.

4.7.1. Отримання та аналіз методом IRAP-ПЛР трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці

Матеріалом досліджень був сорт-дворучка 'Зимоярка', створений в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Для отримання калюсних культур як експланти використовували апікальну меристему пагона 3-добових стерильних проростків, попередньо вирощених в умовах *in vitro*. Вихідний калюс розділяли на дві частини. Одну частину було використано для проведення генетичної трансформації, іншу – паралельно пасажували на живильному середовищі МС (Бавол та ін., 2012). Генетичну трансформацію здійснювали біолістичним методом, використовуючи саморобну гармату типу particle inflow gun (PIG). В дослідженнях була використана векторна конструкція рАНС25, яка містить селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що забезпечує стійкість трансформованих клітинних ліній до фосфінотрицину, та репортерний ген β -глюкуронідази (*uidA*). Для проведення ПЛР був використаний одиничний праймер до довгих кінцевих повторів (LTR) соєвого ретротранспозону SIRE-1, що має таку нуклеотидну послідовність: 5'-GCACT TATGC AAGTG GGATC AGC-3' (Календарь, Глазко, 2002). Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,6 % агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення проводилось за напруги 2 В/см в трис-ацетатному буфері. Спектри продуктів ПЛР візуалізовували під УФ-променями. Для оцінки розмірів ампліконів застосовували маркер 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

В наших дослідженнях були використані калюси 14- та 28-добового віку. Загалом було отримано 1600 калюсів у експериментальних варіантах та вдвічі менше для контролю. Добір трансформованих клітинних ліній здійснювали на середовищі з фосфінотрицином. У роботі застосовували дві схеми селекції: пряму та ступінчасту. За прямої селекції *in vitro* калюси висаджували на середовище з 10 мг/л фосфінотрицину. Після трьох пасажів

було отримано 4 стійкі клітинні лінії у варіанті з 14-добовими калюсами та 9 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калюсами. Також використовували ступінчасту клітинну селекцію: після трансформації калюси висаджували на середовище з 2 мг/л фосфінотрицину, а у наступних двох пасажах концентрацію селективного агента збільшували відповідно до 5 та 10 мг/л. Завдяки такому підходу вдалося отримати 7 клітинних ліній у варіанті з 14-добовими калюсами та 11 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калюсами. В той же час, у контрольному варіанті за прямого та ступінчастого добору стійких до фосфінотрицину клітинних ліній отримано не було.

В подальшому для виявлення стабільної експресії гена *uidA* проводили гістохімічне фарбування тканин калюсу через 42 доби після трансформації (останній пасаж на селективному середовищі). Для цього відбирали невеликі шматочки з калюсів, які задовольняли наступним критеріям: активно росли на селективному середовищі з фосфінотрицином та зберігали морфогенний потенціал. Загалом, з 31 отриманої клітинної лінії тільки 18 задовольняли даним параметрам. Експресія гена *uidA* (за фенотипічним проявом) була підтверджена у 10 клітинних ліній (рис. 4.29). Однак за подальшого культивування три лінії були відбраковані, оскільки мали низьку динаміку росту на селективному середовищі. Таким чином, нами було відібрано 7 клітинних ліній у яких відмічено експресію генів *bar* (фенотипова ознака – активний ріст на середовищі з селективним агентом – фосфінотрицином) та *uidA* (фенотипова ознака – наявність стабільного забарвлення калюсів).



Рис. 4.29. Експресія репортерного гена *uidA* (за фенотипом). **А** – транзійтна експресія (24 год після біолістичної трансформації), випадково вибрані зразки; **Б** – стабільна експресія (42 доба після біолістичної трансформації).

Щоб підтвердити трансгенний статус отриманих клітинних ліній, проводили ПЛР-аналіз (рис. 4.30), який довів наявність гена *bar* в ДНК досліджуваних об'єктів.

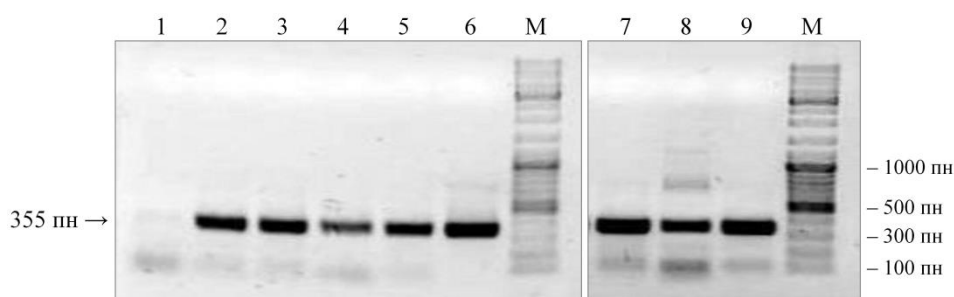


Рис. 4.30. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків з використанням праймерів до гена *bar* (очікуваний розмір фрагмента 355 п.н.): 1 – негативний контроль, ДНК нетрансформованого калюсу; 2 – клітинна лінія LT1; 3 – LT2; 4 – LT3; 5 – LT4, 6 – позитивний контроль рАНС25; 7 – клітинна лінія LT5; 8 – LT6; 10 – LT7, М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder.

Паралельно з добором на селективних середовищах здійснювали IRAP аналіз матеріалу на стадії первинного калюсу, а також на 3-му та 6-му пасажах. Дослідження проводили на семи клітинних лініях (LT1–LT7). Контролем слугували калюси (контрольні групи по 10 калюсів), які не піддавали трансформації, але культивували за таких самих умов та на тих самих середовищах.

Відомо, що в процесі сумісної еволюції сформувались механізми, що захищають геном хазяїна від чужорідної транспозиції, зокрема описано її пригнічення на транскрипційному (сайленсинг шляхом метилування ДНК) та посттранскрипційному (сайленсинг за рахунок РНК-інтерференції) рівнях (Lister et al., 2008). Тому за звичайних умов активність ретротранспозонів відсутня або спостерігається на незначному рівні (Choulet et al., 2010). В

умовах експерименту нам не вдалося зафіксувати транспозицію у вихідних та контрольних форм. Загалом, у нетрансформованих первинних калюсах, а також калюсах 3-го та 6-го пасажів виявлено 10 чітких ампліконів розміром від 407 до 1360 п.н. У всіх досліджуваних об'єктів показано ідентичний спектр продуктів ПЛР. На рис. 4.31 представлено по одному зразку із кожної досліджуваної вибірки.

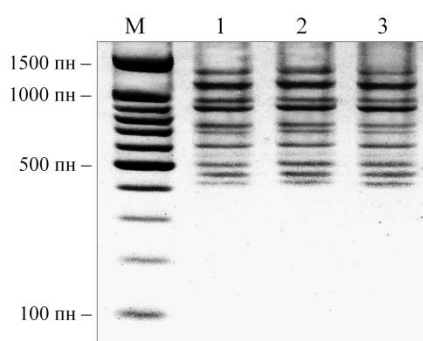


Рис. 4.31. Спектр продуктів ампліфікації ДНК: М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder; 1 – первинний нетрансформований калюс; 2 – нетрансформований калюс 3-го пасажу; 3 – нетрансформований калюс 6-го пасажу.

Наступним етапом досліджень було виявлення поліморфізму ДНК у трансформованих форм. Для цього відбирали зразки калюсних ліній LT1–LT7. Отримані результати представлені на рис. 4.32. На отриманих електрофореграмах продуктів ПЛР кожен амплікон відповідає анонімному локусу між двома близько розташованими копіями SIRE-1, оскільки застосований праймер споріднений до LTR-послідовностей, а загальна довжина цього ретротраспозону становить близько 12 тис. п.н., що робить неможливим синтез фрагментів в межах однієї копії. Таким чином, кожен новий виявлений амплікон фіксує виникнення нового міжретранспозонового локусу, тобто свідчить про подію транспозиції.

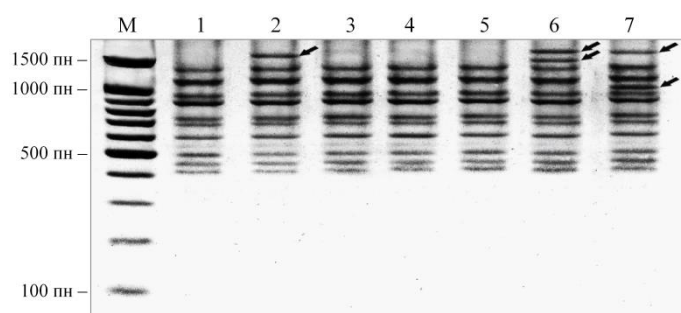


Рис. 4.32. Спектр продуктів ампліфікації ДНК: М – маркер молекулярної маси 100 bp DNA Ladder; 1 – клітинна лінія LT1; 2 – LT2; 3 – LT3; 4 – LT4, 5 – LT5; 6 – LT6; 7 – LT7. Стрілками показані нові амплікони.

Нами відмічено появу нових, відносно високомолекулярних (довжиною більше 1000 п.н.) ампліконів у трьох трансформованих ліній – LT2, LT6 та LT7 (табл. 4.9). Зокрема у двох останніх виявлено по два амплікони.

Таблиця 4.9

Приблизна довжина нових виявлених ампліконів у трансформованих лініях

Зразок	Кількість нових ампліконів	Приблизна довжина ампліконів, п.н.
LT2	1	1567
LT6	2	1491, 1660+*
LT7	2	1075, 1660+*

Примітки: *– за обрахунку довжини ампліконів на пакеті прикладних програм TotalLab v.2.01 отримано значення 1660 п.н. (лінія LT6) та 1651 п.н. (лінія LT7), однак оскільки різниця між цими значеннями менша інструментальної похибки методу (що включає роздільну здатність електрофоретичного методу та похибку обчислення), фрагменти нами умовно позначені як 1660+, що може свідчити як про їхню ідентичність, так і абсолютну неподібність за нуклеотидним складом (локусом транспозиції).

Поява кількох нових ампліконів, а також те, що вони були виявлені у трьох із семи досліджуваних клітинних ліній, може свідчити про відносно високу частоту подій транспозиції у ДНК трансформованих клітинних ліній. За умов проведеного експерименту нами не зареєстровано зникнення ампліконів в ДНК-профілях ПЛР, що може свідчити про відсутність перебудов у сайтах зв'язування з праймером та в досліджуваних локусах, фланкованих LTR ретротранспозону SIRE-1.

Слід зазначити, що в літературних джерелах була описана транспозиційна активність ретротранспозонів *Tos17* у трансформованих

рослин рису (Wu et al., 2009) та *Tag1* в арабідопсису (Bhatt et al., 1998). Автори також відмічають відсутність такої активності у контрольних рослин. Хоча використаний нами метод не дозволяє безпосередньо виявити транскрипційну та транспозиційну активність ретротранспозонів, однак він може бути швидким та ефективним інструментом дослідження змін геному за генетичної трансформації та підтвердження транспозиції МГЕ.

Таким чином, методом біолістичної трансформації нами були отримані трансформовані клітинні лінії м'якої пшениці та підтверджений їх трансгенний статус. За допомогою молекулярно-генетичного аналізу за використання IRAP-ПЛР з праймером до LTR послідовностей ретротранспозону SIRE-1, у трьох трансформованих ліній – LT2, LT6 та LT7 виявлено появу нових, відносно високомолекулярних (довжиною більше 1000 п.н.) ампліконів, що свідчить про транспозицію даного МГЕ. Оскільки нові фрагменти ДНК виявлені у трьох з семи досліджуваних ліній та були відсутні у контрольному калюсі, це може свідчити, що індукція транспозиції SIRE-1, можливо, зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК, або стресом безпосередньо пов'язаним з процесом трансформації (мікропоранення, культивування на селективних середовищах).

4.7.2. IRAP-аналіз трансгенних рослин-регенерантів пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази

Метою нашої роботи було проаналізувати рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозонів у трансгенних рослин пшениці, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*.

Матеріалом досліджень були: 1) вихідні рослини м'якої пшениці сорту 'Зимоярка' (10 рослин); 2) контрольні рослини-регенеранти R₀ покоління,

отримані з калюсів, без проведення генетичної трансформації (10 рослин); 3) трансгенні рослини-регенеранти сорту 'Зимоярка' (10 рослин) T₀, отримані методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням штаму AGL0, який містить бінарну векторну конструкцію pBI2E, до складу якої входить гетерологічний дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази арабідопсису, а також селективний ген неоміцинофосфотрансферази II (*nptII*) *E. coli*. Умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації представлено у роботі (Бавол та ін., 2014). Трансгенний статус рослин перевірено методом ПЛР.

На першому етапі дослідження важливо було переконатися в ефективності досліджуваних праймерів та можливості їх застосування для аналізу геному пшениці. Для цього згідно описаних методик проводили ПЛР з кожним індивідуальним праймером на зразках ДНК 10 довільних рослин вихідного сорту. За характером отриманих спектрів продуктів ампліфікації ДНК було виділено праймери, які виявилися придатними для подальшого використання: Su, Sa, Wh, Ni та Wi1, за використання яких в спектрах продуктів ПЛР можна чітко ідентифікувати визначену кількість ампліконів, а інші виявилися неефективними.

Спочатку ми провели визначення генетичної гомогенності контрольних рослин за досліджуваними локусами. Всі високоефективні праймери (Su, Sa, Wh, Ni, Wi1) продукували в ПЛР ідентичні спектри продуктів ампліфікації з ДНК різних зразків (рис. 4.33).

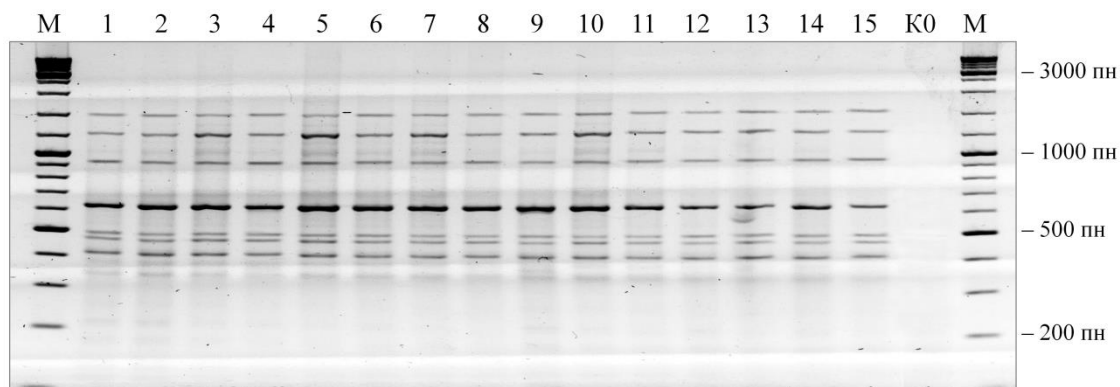


Рис. 4.33. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків на прикладі використання праймеру Sa: М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder Mix; доріжки 1–7 – рослини вихідного сорту ‘Зимоярка’; 8–15 – контрольні рослини-регенеранти; K0 – негативний контроль, ТЕ-буфер без ДНК.

Отримані дані свідчать, що у вихідному матеріалі (рослинах) за досліджуваними локусами відсутній природний та/або спонтанний поліморфізм. В умовах експерименту нам не вдалося спостерігати транспозицію у вихідних та контрольних форм. Загалом, у вихідних рослин спектр продуктів ампліфікації ДНК, залежно від використаного праймера, складався з 7–16 фрагментів, розміром від 305 до 1517 п.н.

Наступним етапом роботи було виявлення поліморфізму ДНК в геномі трансгенних рослин пшениці, які несуть дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази. Для цього застосовували праймери, що показали свою ефективність на контрольних рослинах. При використанні всіх високоефективних праймерів у трансгенних рослин поліморфізму ДНК виявлено не було (рис. 4.34 а, б).

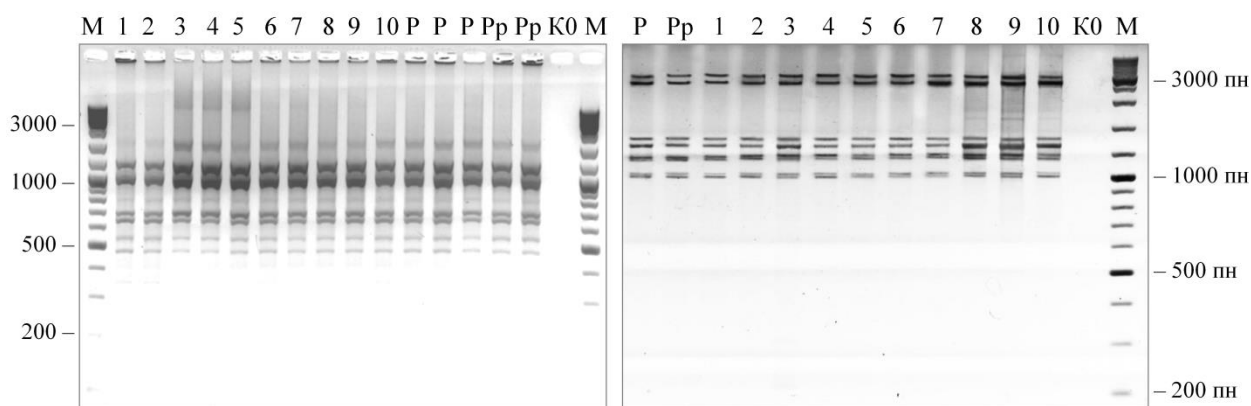


Рис. 4.34. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання праймеру Su (ліворуч) та Ni (праворуч): М – маркер молекулярної маси GeneRuler DNA Ladder Mix; Р – рослина вихідного сорту; Рр – рослина-регенерант, отримана без трансформації; 1–10 – генетично модифіковані рослини; K0 – негативний контроль, ТЕ-буфер без ДНК.

Показано, що в процесі сумісної еволюції сформувались механізми, що захищають геном хазяїна від чужорідної транспозиції, зокрема описано її пригнічення на транскрипційному та посттранскрипційному рівнях (Casacuberta, Santiago, 2003; Lister et al., 2008). Тому, за звичайних умов активність ретротранспозонів відсутня або має незначний рівень (Choulet et al., 2010; Vicient et al., 2010). Відповідно до припущення про існування механізму репресії мобільних елементів, пов'язаного з утворенням дволанцюгової РНК, короткі РНК, відповідні послідовностям ретротранспозонів, були виявлені і у рослин (Vicient et al., 2010). При цьому репресія посилюється при збільшенні числа копій трансгена в геномі і наростає протягом декількох поколінь. У зв'язку з цим, відсутність поліморфізму ДНК у трансгенних рослин пшениці з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, можливо, може бути пов'язана з явищем РНК-інтерференції, яка пригнічує активність ретротранспозонів.

Роботи останніх років показали, що короткі РНК беруть участь у регуляції експресії безлічі генів організму, а також в репресії мобільних елементів (Martienssen, 2001; Mello, 2004; Tishchenko et al., 2014). Молекулярний механізм РНК-інтерференції представляється в такий спосіб. Довгі молекули дволанцюгової РНК нарізаються в клітині нуклеазами сімейства Dicer на короткі РНК довжиною близько 20–25 нуклеотидів (siРНК short interfering RNA). Потім siРНК можуть включатися до складу РНП комплексу RISC (RNA induced silencing complex), який забезпечує взаємодію одного з ланцюгів короткої РНК з комплементарними молекулами РНК, присутніми в цитоплазмі клітини, зокрема, мРНК (Meister, Tuschl, 2004). Комплекс RISC здійснює розрізання молекул мРНК-мішені в ділянках, повністю комплементарних коротким РНК, в результаті чого мРНК деградує. Поряд з посттранскрипційною репресією мРНК в цитоплазмі, короткі РНК можуть пригнічувати транскрипцію гомологічного гена в ядрі. РНП комплекс, що містить siРНК, який в цьому випадку позначають як RITS

(RNA-induced initiation of transcriptional silencing), викликає локальну зміну структури хроматину (Verdel et al., 2004).

У рослин короткі РНК викликають репресію хроматину комплементарних їм генів, що відбувається як за рахунок метилування гістонів, так і в результаті метилування цитозину в ДНК (Mette et al., 2000). Наявність дволанцюгових РНК, гомологічних мобільним елементам, дозволяє клітинному апарату РНК-інтерференції пригнічувати їх експресію, яка часто шкідлива для організму, оскільки призводить до транспозиції і, як наслідок, до мутацій і хромосомних перебудов (Gvozdev, 2003). Однак залишається нез'ясованим, чи бере участь апарат РНК-інтерференції в репресії хроматину ретротранспозонів, чи пригнічення експресії відбувається виключно на посттранскрипційному рівні в результаті деградації транскриптів. Необхідна для включення механізму РНК-інтерференції дволанцюгова РНК може надходити ззовні або утворюватися при транскрипції трансгенів, що несуть інвертований повтор. Крім того, при інтеграції трансгенів у геном хазяїна дволанцюгова РНК часто утворюється в результаті аберантної транскрипції під промотором, розташованим поруч з сайтом вбудовування трансгена (Makarova, Cramers, 2007). Також була виявлена здатність дволанцюгових РНК здійснювати деградацію і не комплементарних їм послідовностей. Цей феномен був названий транзитивною (transitive) РНК-інтерференцією (Sijen et al., 2001; Alder et al., 2003).

Таким чином, нами проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами різних ретротранспозонів, у генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, та не виявлено їх відмінностей від нетрансгенних форм за генетичною структурою. За використання вискоєфективних праймерів до ретротранспозонів Sukkula, Sabrina, Wham, Nikita та Wilma1, а також підібраних пар цих IRAP-

праймерів, у трансгенних рослин поліморфізму ДНК також не виявлено. У спектрах продуктів ампліфікації ДНК не відмічено появи нових ампліконів, що свідчить про відсутність активації транспозиційної активності МГЕ у досліджених трансгенних рослин з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази.

Підсумовуючи, слід зазначити, що в результаті проведеної роботи оптимізовано умови *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Вперше вивчено вплив синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Підібрано компоненти живильного середовища МСР4 (0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам), які підвищують частоту регенерації пагонів у пшениці до 35 %. Утворені на такому культуральному середовищі рослини здатні адаптовуватися до ґрунтових умов та характеризуються високою життєздатністю.

Розроблено ефективну систему елімінації клітин *A. tumefaciens* штамів С58 та GV3101, яка передбачає використання антибіотика β-лактамної групи тиментину. Вперше досліджено дію цього антибіотика на морфогенетичні процеси у пшениці. Для стимуляції регенераційних процесів у різних генотипів пшениці потрібно індивідуально підбирати концентрації антибіотиків.

Нами досліджена можливість використання антибіотика тиментину як самостійного екзогенного регулятора росту пшениці. Для цього вивчали його дію на утворення морфогенного калюсу і регенерацію пагонів сортів 'Подільська' та 'Зимовка' без залучення інших екзогенних регуляторів росту. Тиментин проявляв ауксиноподібні властивості: за його наявності у живильному безгормональному середовищі спостерігали інтенсивний ризогенез, однак він може бути використаний лише як додатковий стимулятор морфогенетичних процесів у пшениці.

Розроблено протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*, який включає використання: оптичної щільності клітин бактеріальної суспензії $OD_{600} = 0,4$ оп.од.; ацетосирінгону у концентрації 200 мкМ; антибіотика паромоміцину в якості селективного агента.

З використанням оптимізованого протоколу проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур пшениці генетичними векторами p014 та pCB203. Частота трансформації вектором p014 сорту 'Подільська' становила 2,7 %, а сорту 'Зимовка' – 2,4 %. Після використання вектора pCB203 (селективний агент фосфінотрицин) частота трансформації калюсу, одержаного з незрілих зародків пшениці сорту 'Зимовка', становила 1,2 %, а з калюсу апікального походження – 1,6 % (сорт 'Зимовка') та 1,8 % (сорт 'Подільська'), що свідчить про однакову ефективність використання калюсу пшениці м'якої різного походження для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Але калюси, отримані з апікальних меристем пагона, доступні для використання впродовж цілого року, що робить їх більш привабливими для отримання трансформантів пшениці.

Оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, в результаті чого частота трансформації пшениці зросла до 20,7 %. Доведено можливість отримання трансформантів пшениці *Triticum aestivum* сорту вітчизняної селекції 'Подільська' даним методом. Підтверджено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації рослин *in planta*. За її наявності частота трансформації становила 2,3 %, а за відсутності – 15,6 % (ген *bar*) та 20,7 % (ген *nptII*). Частота трансформації за використання методу *in planta* на порядок вища, ніж за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Але можливість проведення мікроділянкових експериментів тільки впродовж часу цвітіння пшениці в природних умовах обмежує використання цього методу.

У роботі показаний вплив умов навколишнього середовища на процес трансформації пшениці методом *in planta*. Для сорту 'Подільська'

температурний режим $t \approx 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ і помірна вологість повітря сприяють максимальній ефективності зав'язування насіння ($40,6 \pm 1,5\%$) та отриманню трансформантів (7,3 %). При зниженні температури до $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ відбувається зменшення ефективності перенесення Т-ДНК у рослинний геном. При підвищенні температури до $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ частота появи трансгенних за геном *bar* рослин дещо знижується і становить 2 %. Ймовірно, це пов'язано із блокуванням утворення *Vir*-залежних агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК, і для яких високі температурні показники є критичними.

Трансгенна природа рослин пшениці, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta* підтверджена за допомогою ПЛР, ЗТ-ПЛР. Про експресію *bar* гена також свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду як в умовах *in vitro*, так і в умовах мікроділянкового досліду. Вперше отримано рослини пшениці сортів 'Подольнка' та 'Зимоярка', стійкі до гербіциду Баста®.

На підставі отриманих даних можна зробити наступні висновки:

- проведена оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Вперше вивчено вплив синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калусної культури пшениці апікального походження;
- розроблено ефективну систему елімінації клітин *A. tumefaciens*, яка передбачає використання антибіотика β -лактамної групи тиментину;
- вперше досліджено вплив β -лактамного антибіотика тиментину на морфогенетичні процеси у пшениці м'якої. Показано, що він має властивості регулятора росту, однак може бути використаний лише як додатковий стимулятор морфогенетичних процесів у пшениці;
- оптимізовано протокол *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* та методом *in planta*;

- показано залежність частоти отримання трансгенних рослин *T. aestivum* методом *in planta* від умов навколишнього середовища, зокрема температурного режиму;
- вперше отримано рослини пшениці сортів ‘Подільянка’ та ‘Зимоярка’, стійкі до фосфінотрицину (гербицид Баста®). Трансгенна природа рослин підтверджена методами ПЛР, ЗТ-ПЛР;
- методом IRAP-аналізу з праймером до LTR послідовностей ретротранспозону SIRE-1 трансформованих калюсних ліній пшениці виявлено появу нових, відносно високомолекулярних (довжиною більше 1000 п.н.) ампліконів, що свідчить про транспозицію даного МГЕ. Оскільки, нові фрагменти ДНК виявлені у трьох з семи досліджуваних ліній та були відсутні у контрольному калюсі, це може свідчити, що індукція транспозиції SIRE-1, можливо, зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК, або стресом, безпосередньо пов'язаним з процесом трансформації;
- у генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, не виявлено відмінностей від нетрансгенних форм за генетичною структурою.

Публікації пошукача, видані за даним розділом:

1. Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, 2018. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Физиология растений и генетика*, 50(3), с. 187–217, DOI: 10.15407/frg2018.03.187
2. Жалій Н.А., Банникова М.О., Плугатар М.О., Великожон Л.Г., Тараненко А.М., **Моргун Б.В.**, 2018. Дослідження прояву трансгенів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta* пшениці *Triticum aestivum* L. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 16(2), с. 159–165, DOI: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1053

3. Плугатар М.О., Жалій Н.А., Банникова М.О., **Моргун Б.В.** Молекулярно-генетичний аналіз регенерантів пшениці *Triticum aestivum* L. методом ПЛР. Збірник наукових праць II Міжнародної науково-практичної дистанційної конференції «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології», вип. 4, Харків, 1–2 березня 2018 р. – с. 181–184.
4. Гнатюк І.С., Горбатюк І.Р., Банникова М.О., **Моргун Б.В.**, 2016. Синергічна дія антибіотиків тиментину та цефтріаксону на регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 19, с. 102–105.
5. Горбатюк І.Р., Щербак Н.Л., Банникова М.О., Великожон Л.Г., Кучук М.В., **Моргун Б.В.**, 2016. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Физиология растений и генетика*, 48(1), С. 65–74.
6. Моргун В.В., Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, 2016. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 48(3). С. 196–214.
7. Gorbatyuk I.R., Bovol A.V., Holubenko A.V., **Morgun B.V.**, 2015. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka. *Biotechnologia Acta*, 8(1), P. 56–62.
8. Горбатюк І.Р., Бавол А.В., Банникова М.О., **Моргун Б.В.**, 2015. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого сорту Подолянка. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*, 24(1153), С. 47–53.
9. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Банникова М.О., **Моргун Б.В.**, 2015. Позитивний вплив антибіотика тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 17, С. 136–140.
10. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Тараненко А.М., Банникова М.О., **Моргун Б.В.**, 2015. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність

калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка. *Физиология растений и генетика*, 47(6), С. 514–525.

11. Горбатюк І.Р., Бавол А.В, **Моргун Б.В.**, 2014. Агробактеріальна трансформація *in planta* пшениці озимого сорту Подолянка та ярого сорту Bobwhite. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 15, С. 35–39.

12. Бавол А.В., **Моргун Б.В.**, Нітовська І.О., Рудас В.А., Дубровна О.В. Генетична трансформація пшениці з використанням калюсних культур, отриманих з апікальної меристеми пагона. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. - Київ: Логос. - 2012. - Т. 4. - С. 411–416.

13. Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. К.: Логос, 2014. – 375 с. ISBN 978-966-171-883-7.

14. **Моргун Б.В.**, Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. К.: Логос, 2014. – 221 с. ISBN 978-966-171-887-5.

15. Волч І.Р., Банникова М.О., Гнатюк І.С., **Моргун Б.В.** Спосіб отримання трансформованих рослин м'якої пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур апікального походження / Патент 77768 України на корисну модель, МПК (2009) А01Н 1/00; А01Н 4/00; А01Н 5/00; С12Н 1/21; С12Н 5/04; С12Н 15/00. Заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. – № u2012 10121; Заявл. 19.10.2016.

16. **Morgun B.V.**, Dubrovna O.V. IRAP analysis of transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*. 2019, vol. 53, no. 5, pp. 384–391.

Бавол А.В., Дубровна О.В., **Моргун Б.В.** Одержання та аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці. *Biotechnologia Acta*, 2013, Т. 6, № 6, С. 113–119.

РОЗДІЛ 5

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ КУКУРУДЗИ *IN VITRO*

Кукурудза є однією з найважливіших зернових культур в світі, її щорічне виробництво становить близько 700 млн тонн. На даний час вона використовується в якості кормової і харчової культури, в промислових цілях застосовують матеріали, отримані з кукурудзяної сировини. Тому важливим практичним завданням є отримання нових сортів та гібридів кукурудзи, що мають необхідні для цих цілей ознаки. Створення трансгенних рослин, які несуть певні корисні ознаки, методами генетичної інженерії є реальним напрямом генетичного поліпшення кукурудзи.

Тим не менш, до цих пір генетична трансформація кукурудзи залишається серйозною проблемою. На даний час основним способом введення чужорідних генів в рослини злакових є біолістична трансформація. За допомогою цього методу були отримані лінії кукурудзи з декількома агрономічно важливими генами, які надали стійкість до різних шкідників, до гербіцидів суцільної дії і хвороб (Chien-Yuan et al., 2008). Поряд з низкою переваг, цей спосіб має такі недоліки як низька ефективність, нестабільність і малий розмір введених конструкцій, висока вартість.

Значно більшу економічну ефективність і стабільність результатів забезпечує введення генів, опосередковане агробактеріями. Даний метод має декілька переваг порівняно з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною їх перебудовою, простота методик та загалом менша вартість. Цей метод детально розроблений для дводольних рослин, але майже не використовується для однодольних. Хоча в літературі зустрічаються окремі повідомлення про застосування даного методу трансформації до зернових, проте для кукурудзи він розроблений недостатньо. Відомі окремі приклади вдалого використання *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації для отримання генетично модифікованих

рослин кукурудзи (Ishida et al., 1996; Gelvin, 2000; Sairam et al., 2003; Shou et al., 2004; Sidorov et al., 2006).

Основні способи біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи базуються на перенесенні Т-ДНК в культивовані *in vitro* рослинні клітини з подальшою регенерацією трансформованих рослин. Проте використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Крім того, значні труднощі пов'язані з тим, що клітини злаків мало сприйнятливі до дії агробактерії. Тому розробка ефективних методик трансформації кукурудзи за допомогою біолістичного підходу та *A. tumefaciens* є актуальною задачею.

Стійкість до гербіцидів є однією з важливих ознак сільськогосподарських рослин, зокрема кукурудзи (*Zea mays* L.). Вона не є природною, проте її можна досягти шляхом генетичної трансформації. У зв'язку з цим, метою нашої роботи була оптимізація окремих параметрів біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та отримання трансгенних рослин кукурудзи, стійких до гербіцидів.

5.1. Отримання та аналіз трансгенних рослин-регенерантів кукурудзи, що містять ген *cp4 epsps*

Отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів, є одним із головних напрямів створення біотехнологічних рослин для сільського господарства (EU Register of Authorised GMOs, 2014; USDA, 2013). Найчастіше вводять гени, які забезпечують стійкість рослин до гліфосату, імідазолінонів, біалофосу. Гліфосат (N-фосфометилгліцин) є гербіцидом системної дії, найпоширенішим у світі. Він інгібує фермент метаболічного шляху шикімової кислоти 5-енолпірувілшикімат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), блокуючи біосинтез бензоїдних ароматичних сполук, в тому числі незамінних амінокислот (фенілаланіну, триптофану, треоніну), внаслідок

чого рослина гине (Amrhein et al., 1980). Фермент працює в хлоропластах рослин та кодується ядерним геном. Слід зауважити, що у тварин, в тому числі людини, синтез бензоїдних ароматичних сполук відбувається іншим шляхом і не інгібується гліфосатом. Одним із напрямів створення рослин, стійких до гліфосату, є введення мутантного гена *epsps*, продукт якого має низьку спорідненість до гліфосату (Zhou et al., 1995; Howe et al., 2002; Chhареkar et al., 2015). Одним із таких генів є *cp4 epsps*, який було виділено з агробактерії штаму CP4 (Padgett et al., 1995). У трансгенній рослині він забезпечує стійкість до дії гербіциду, повністю компенсуючи функцію нативного рослинного ферменту EPSPS. Метою дослідження було перенесення гена *cp4 epsps* в геном кукурудзи методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*.

5.1.1. Регенераційна здатність калюсу кукурудзи тривалого культивування

Зазвичай калюс, отриманий від незрілих зародків, зберігає свою регенераційну здатність протягом року культивування, а потім її втрачає, або майже втрачає (різко зменшується частота регенерації). Нами був виокремлений гібрид R₂PLS61×PLS61, калюс якого зберігає свою регенераційну здатність впродовж понад двох років (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Регенерація пагонів з калюсу гібрида R₂PLS61×PLS61.

Лінія R₂PLS61 походить від інбредної лінії PLS61, проведеної через культуру *in vitro*, регенеранти якої були висадженні у ґрунт, та отримане насіння. Калюс, отриманий від незрілих зародків гібрида F₁ R₂PLS61×PLS61 між соматоклональною лінією R₂PLS61 та лінією PLS61, має частоту регенерації (75 %), вищу порівняно з вихідною лінією PLS61 (66,6 %). Незрілі зародки гібрида F₁ кукурудзи R₂PLS61×PLS61 були надані нам Державною установою Інститут сільського господарства степової зони (м. Дніпро).

Таким чином, нами був виокремлений гібрид надзвичайно перспективний для досліджень з генетичної трансформації кукурудзи у зв'язку з його високим регенераційним потенціалом, який зберігається протягом тривалого культивування.

5.1.2. Використання гліфосату в якості селективного агента

У зв'язку з тим, що під час трансформації трапляються випадки вбудовування не цілого вектору, а його частини (Shrawat et al., 2006), або через можливу низьку експресію цільового гена в трансгенних рослинах, які відбирали завдяки експресії іншого селективного гена (Сахно, 2015), для отримання трансгенних рослин, стійких до гліфосату, найкращим є використання цього гербіциду в якості селективного агента.

Повідомляють, що селекція на гліфосаті має ряд переваг для кукурудзи над іншими селективними маркерами загального використання: по-перше, це низька частота отримання нетрансгенного матеріалу в результаті селекції, по-друге, вкрай низька ймовірність виникнення мутацій стійкості до гліфосату (Howe et al., 2002). Проте у світі є небагато робіт, які описують використання гліфосату в якості селективного агента (Zhou et al., 1995; Howe et al., 2002; Sidorov, Duncan, 2009), і не в усіх випадках така селекція була успішною (Howe et al., 2002, Сахно, 2015). Також існує певна природна мінливість у рівні чутливості до гліфосату кукурудзи різних генотипів (Forlani, 1995). В

зв'язку з цим, для отримання стійких до гліфосату рослин важливо дослідити умови селекції на гліфосаті для конкретних генотипів та експлантів.

У попередні роки нами була відпрацьована методика отримання трансгенних калюсних ліній кукурудзи після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенного калюсу на середовищах із гліфосатом в якості селективного агента (Нітовська та ін., 2017). Проте, для регенерації трансформованих рослин використовували не гліфосат, а паромоміцин, оскільки вектор pCB135 містив поряд з геном *cp4 epsps* ген *nptII*, продукт якого надає стійкість до аміноглікозидних антибіотиків. Було отримано 16 регенерантів, які при подальшому культивуванні *in vitro* на селективному середовищі з паромоміцином, засохли. Паромоміцин характеризується м'якою дією на експланти (Nitovska et al., 2015). Щоб збільшити ймовірність отримання стійких до гліфосату трансформантів кукурудзи та уникнути появи нетрансформованих рослин, ми вирішили на етапі регенерації рослин використовувати гліфосат замість паромоміцину.

Використання схеми селекції, запропонованої Сидоровим і Дунканом (Sidorov, Duncan, 2009) з використанням 0,1 мМ та 0,25 мМ концентрацій гліфосату на етапі калюсогенезу та 0,1 мМ гліфосату в регенераційному середовищі, було ефективним для отримання трансгенного калюсу кукурудзи (Нітовська та ін., 2017). У своїй статті Гоув і співавт. (Howe et al., 2002) описують можливість отримання трансгенних рослин кукурудзи, використовуючи концентрації гліфосату у 10 разів менші, ніж ті, що використовувалися нами спочатку, а саме 0,01 мМ, або середовища зовсім без гліфосату. Тому, ми вирішили змінити схему селекції на етапі регенерації, проводячи 2–3 пасажі калюсу на середовищі з 0,01 мМ гліфосату, а потім зовсім його прибирати на завершальних етапах селекції трансгенних рослин кукурудзи.

5.1.3. Вплив селективних агентів на регенераційну здатність калюсу кукурудзи гібрида R₂PLS61×PLS61

Для того, щоб оцінити ефективність різних схем селекції трансгенних рослин, ми протестували вплив додаткових складових селективних середовищ, а саме, цефотаксиму, паромоміцину, фосфінотрицину та гліфосату на регенераційний потенціал калюсу гібрида R₂PLS61×PLS61. Для цього були використані п'ять живильних середовищ. В якості базового регенераційного середовища використовували модифіковане середовище MSGR (Sidorov, Duncan, 2009), яке містило 0,25 мг/л БАП (№ 1). Середовище № 2 містило додатково 500 мг/л цефотаксиму для пригнічення росту агробактерії. Середовище № 3 містило 500 мг/л цефотаксиму та 5 мг/л фосфінотрицину в якості селективного агента. Середовище № 4 містило 500 мг/л цефотаксиму та 100 мг/л паромоміцину. Середовище № 5 містило 500 мг/л цефотаксиму та 0,01 мМ гліфосату в якості селективного агента. Калюси, які культивували у темряві при 27 °С, переносили на регенераційні селективні середовища № 1–5 та культивували в умовах освітлення з фотоперіодом 14/10 год при температурі 25 °С з пересаджуванням на свіжі середовища кожні 2 тижні. Через 6 тижнів були отримані наступні результати (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Вплив різних селективних агентів на морфогенез та регенераційну здатність калюсу кукурудзи гібрида R₂PLS61×PLS61

Середовище	Кількість висаджених калюсів, шт	Калюси, що утворили пагони		Морфогенні калюси	
		шт	%	шт	%
1	20	15	75,0	17	85,0
2	18	17	94,4	17	94,4
3	20	0	0	4	20,0
4	19	13	68,4	14	73,7
5	28	3	10,7	7	25,0

Внесення в середовище цефотаксиму в концентрації 500 мг/мл не мало негативного впливу на регенераційну здатність калюсу. Навпаки, частота регенерації зросла з 75 % у контролі до 94,4 % (табл. 5.1). Паромоміцин мав незначний пригнічувальний ефект на морфогенетичний потенціал калюсу (рис. 5.2). Отже його використання в схемах селекції трансгенних рослин кукурудзи може призвести до отримання великої кількості «хибних» трансформантів, що ми і спостерігали раніше (Нітовська та ін., 2017), та, відповідно, зайвих зусиль, витрат часу, коштів для їх підтримування, вирощування та аналізу.

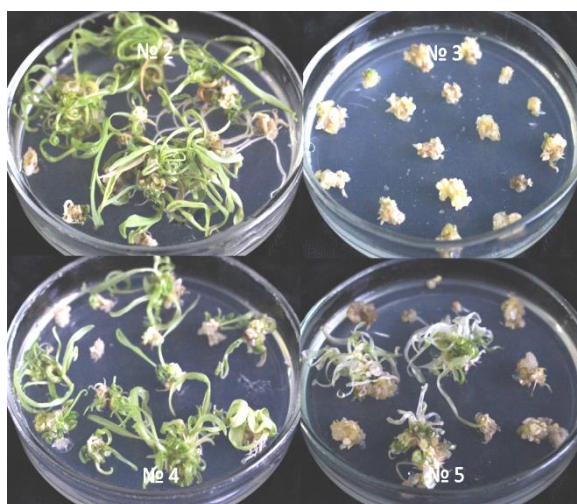


Рис. 5.2. Регенерація пагонів з калюсів гібрида R₂PLS61×PLS61 після культивування на селективних середовищах № 2–5 протягом 6 тижнів.

Повністю пригнічувало регенераційну здатність калюсу використання у селективному середовищі фосфінотрицину. При використанні гліфосату у середовищі в якості селективного агента, спостерігали регенерацію пагонів лише з трьох калюсів (рис. 5.2). Проте, пагони були переважно знебарвлені, а ті, що виглядали зеленими, згодом знебарвлювалися при подальшому культивуванні в наступні 6 тижнів. Отже, гліфосат у концентрації 0,01 мМ не чинить жорсткого незворотного впливу на регенераційний потенціал калюсу, а має більш позитивну дію порівняно з фосфінотрицином, який часто використовується в середовищах в якості селективного агента для відбору трансгенних рослин злакових (Anami et al., 2013).

5.2. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація морфогенного калюсу кукурудзи гібрида R₂PLS61×PLS61

Нами проведений експеримент з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсу гібрида R₂PLS61×PLS61. Для генетичної трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101, який містив вектори pCB133 (Сахно, 2011) та pCB135 (Нітовська та ін., 2017). До складу векторів входили гени *cp4 epsps* під контролем промотора гена 35S вірусу мозаїки цвітної капусти та гени – *bar*, продукт якого надає стійкість до фосфінотрицину, або *nptII*, продукт якого забезпечує стійкість до канаміцину, паромоміцину та інших аміноглікозидних антибіотиків, під контролем промотора нопалінсинтази, залежно від вектора (pCB133 містив ген *bar*, а pCB135 – ген *nptII*).

Нарощування культури агробактерій та *Agrobacterium*-опосередковану трансформацію калюсу кукурудзи виконували за методикою (Sidorov, Duncan, 2009). У живильні середовища для нарощування бактерії додавали 100 мг/л сульфату канаміцину та 100 мг/л карбеніциліну. Оптичну щільність клітин бактеріальної суспензії (ОД₆₀₀) доводили до 0,4–0,5 оп.од. Після трансформації калюси переносили на модифіковане середовище № 6, яке містило 5 мг/л фосфінотрицину, якщо використовували вектор pCB133, або 0,1 мМ гліфосату після трансформації вектором pCB135, та культивували у темряві при 27 °С. За два тижні калюси висаджували на свіжі середовища із фосфінотрицином і гліфосатом, де концентрація гліфосату була збільшена до 0,25 мМ, та вирощували за тих самих умов.

Відібрані стійкі до гербіциду калюси пересаджували на регенераційне середовище MSGR (Sidorov, Duncan, 2009), яке містило 0,25 мг/л БАП, 500 мг/л цефотаксиму та 5 мг/л фосфінотрицину при використанні вектора pCB133, або 0,01 мМ гліфосату, якщо використовували вектор pCB135, і культивували в умовах освітлення при температурі 24–26 °С та 14-годинному

фотоперіоді. Через 6 тижнів культивування калюси переносили на регенераційні середовища без селективного агента, тільки з бактеріостатичним антибіотиком цефотаксимом. Загалом було опрацьовано 392 калюси гібриду R₂PLS61×PLS61 вектором pCB133 та 408 калюсів вектором pCB135. На середовищі із гліфосатом спостерігали множинну регенерацію пагонів (рис. 5.3).



Рис. 5.3. Регенерація пагонів лінії R₂PLS61 після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135 та проведення селекції з використанням гліфосату.

Частота регенерації після трансформації вектором pCB133 становила 3,3 % та 11,5 % – після трансформації вектором pCB135. Отже, виявлено, що гліфосат у концентрації 0,01 мМ менше пригнічував регенераційну здатність калюсу порівняно з фосфінотрицином у концентрації 5 мг/л.

26 пагонів, отриманих після трансформації вектором pCB133, та 129 регенерантів кукурудзи, отриманих після трансформації вектором pCB135, для укорінення були висаджені в банки з безгормональним середовищем MS, яке містило 500 мг/л цефотаксиму. Пагони, які утворили корені, переносили в горщики з ґрунтом та вирощували в умовах теплиці (рис. 5.4). Загалом у ґрунт було висаджено 7 рослин, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB133, що становило майже 27 % від висаджених в банки регенерантів, та 25 рослин після трансформації вектором pCB135, що становило 19,4 % від усіх рослин, висаджених в банки із бактеріостатичним середовищем MS.

Можливо, більший відсоток рослин, які гарно вкорінились та були висаджені в ґрунт, отриманих після трансформації вектором рСВ133, пов'язаний з різними схемами селекції, які використовували для відбору трансформантів, і, відповідно, меншим негативним впливом на рослину фосфінотрицину порівняно з гліфосатом.



Рис. 5.4. Укорінений регенерант кукурудзи лінії R₂PLS61, отриманий після трансформації вектором рСВ135, *in vitro* (а) та рослина в умовах ґрунту (б).

5.2.1. Аналіз ДНК регенерантів на присутність трансгенів

З листочків регенерантів виділяли ДНК та досліджували методом ПЛР на присутність трансгенів *cp4 epsps*, *nptII* та *bar* відповідно до методик (Нітовська та ін., 2012, 2017). Було проаналізовано 20 зразків ДНК регенерантів, в тому числі двох тепличних рослин, отриманих після трансформації вектором рСВ133, та 81 зразок ДНК регенерантів, серед яких сім, отриманих від тепличних рослин, – після трансформації вектором рСВ135. Загалом, було проаналізовано 5 калюсних ліній, відібраних на середовищах із фосфінотрицином після трансформації вектором рСВ133, 6 ліній рослин-регенерантів, а також 23 калюсні лінії, відібрані на селективних середовищах із гліфосатом, отриманих після трансформації вектором рСВ135, та 29 ліній рослин-регенерантів.

Були виявлені амплікони очікуваного розміру в дев'яти зразках ДНК регенерантів, отриманих після трансформації вектором pCB135, при дослідженні на наявність генів *cp4 epsps* та *nptII* (рис. 5.5; 5.6) та в 3 зразках ДНК регенерантів, отриманих після трансформації вектором pCB133 (гени *cp4 epsps* та *bar*). За допомогою ПЛР аналізу на наявність бактеріального гена *virD1*, показано, що ДНК чотирьох регенерантів, отриманих після трансформації вектором pCB135, та двох регенерантів, отриманих після трансформації вектором pCB133, була забруднена ДНК агробактерії, тому отримані результати з аналізу ДНК для цих зразків вважаємо хибними.

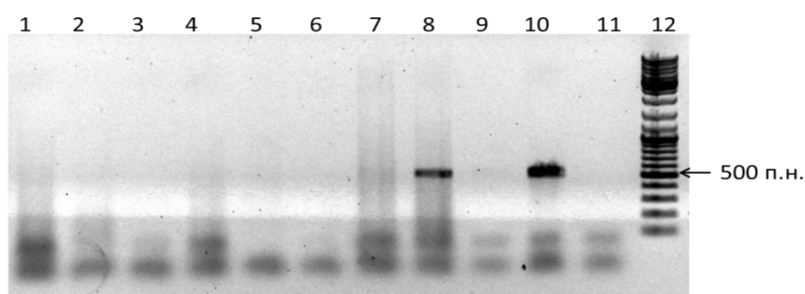


Рис. 5.5. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК регенерантів кукурудзи лінії R₂PLS61 з праймерами до гена *cp4 epsps*. Довжина очікуваного фрагмента – 498 п.н. Доріжки 1–9 – зразки ДНК: 1 – 14-1 (pCB135), 2 – 5-2 (pCB135), 3 – 8-2 (pCB135), 4 – 13-1-1 (pCB135), 5 – 14-1 (pCB135), 6 – 6-5 (pCB135), 7 – 1 (pCB133), 8 – 5 (pCB135), 9 – 8-4 (pCB135); доріжка 10 – позитивний контроль; 11 – негативний контроль; 12 – маркер молекулярної маси ДНК λ /HindIII.

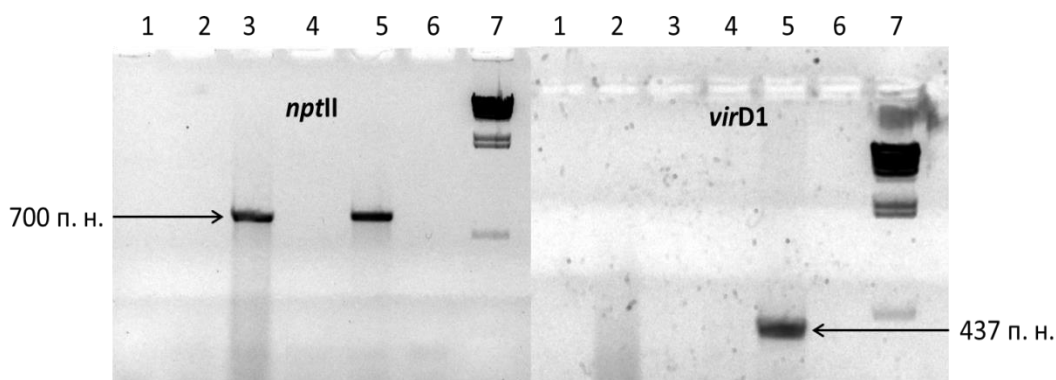


Рис. 5.6. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК регенерантів кукурудзи лінії R₂PLS61 з праймерами до генів *nptII* та *virD1*, отриманих за трансформації вектором pCB135. Довжина очікуваних фрагментів для гена *nptII* – 700 п.н., для гена *virD1* – 437 п.н. Доріжки 1–7 – зразки ДНК: 1 – 14-1, 2 – 6-5, 3 – 5, 4 – 8-4, 5 – позитивний контроль, 6 – негативний контроль, 7 – маркер молекулярної маси ДНК λ /HindIII.

Цікаво, що сигнали на трансгени ставали менш інтенсивними по мірі вирощування регенерантів без селекції до повного зникнення у тепличних рослин (рис. 5.7, доріжки 1, 4, 5 для трансформантів, отриманих за допомогою вектора рСВ135, та доріжки 3 і 7 для регенерантів, отриманих після трансформації вектором рСВ133). Можливо, це відбувається за рахунок метилування трансгена і, таким чином, більш слабкої спорідненості цих ділянок ДНК з відповідними праймерами (Kohli et al., 2010).

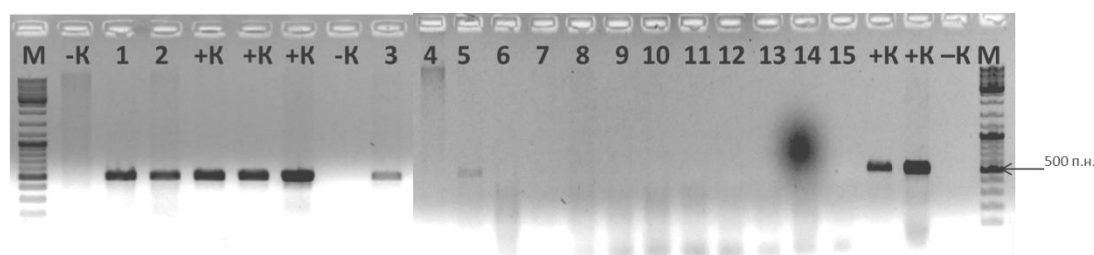


Рис. 5.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК регенерантів кукурудзи лінії R₂PLS61 з праймерами до гена *cp4 epsps* отриманих за трансформації векторами рСВ135 та рСВ133. Доріжки 1–15 – зразки ДНК кукурудзи: 1 – 6 (рСВ135, регенерант з чашки), 2 – 8 (рСВ135, регенерант з чашки), 3 – 1 (рСВ133, регенерант з чашки), 4 – 6-1-1 ((рСВ135, теплична рослина), 5 – 6-1 (рСВ135, регенерант з банки), 6 – 4-1 (рСВ135, регенерант з банки), 7 – 1-1 (рСВ133, регенерант з банки), 8 – 7-1 (рСВ135, регенерант з банки), 9 – 13-1 (рСВ135, регенерант з банки), 10 – 13-1-1 (рСВ135, регенерант з банки), 11 – 6-4 (рСВ135, регенерант з банки), 12 – 1-2 (рСВ133, регенерант з банки), 13 – 13-1-2 (рСВ135, регенерант з банки), 14 – 13-1-8 (рСВ135, регенерант з банки), 15 – 7-1-3 (рСВ135, регенерант з банки); +К – позитивний контроль, –К – негативний контроль, М – маркер молекулярної маси ДНК.

Отже, в результаті використання гліфосату в якості селективного агента після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсу кукурудзи гібрида R₂PLS61×PLS61 було отримано 5 рослин-регенерантів, які містили трансген *cp4 epsps*, продукт якого надає стійкості до гліфосату, та 1 регенерант, що мав в своїй ДНК цей цільовий ген, був отриманий після трансформації вектором рСВ133 та селекції на середовищах із фосфінотрицином.

Таким чином, отримано трансгенні регенеранти кукурудзи, які містили ген *cp4 epsps*, після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсу гібрида R₂PLS61×PLS61 як вектором рСВ135, так і вектором рСВ133, з

використанням гліфосату або фосфінотрицину для відбору трансгенних пагонів. Частота трансформації за результатами аналізу ДНК методом ПЛР (відношення кількості «позитивних» зразків до загальної кількості проаналізованих зразків) становила 6,2 % після трансформації вектором pCB135 та 5,0 % – після трансформації вектором pCB133. 17,4 % проаналізованих калюсних ліній, відібраних на середовищах із гліфосатом після трансформації вектором pCB135, утворили трансгенні рослини та одна лінія із п'яти проаналізованих (20 %), відібраних на середовищах із фосфінотрицином після трансформації вектором pCB133, дала початок трансгенній рослині.

5.2.2 *Agrobacterium*-опосередкована трансформація морфогенного калюсу векторами p12 та p13

Було поставлено 7 експериментів з *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації морфогенного калюсу кукурудзи, з використанням конструкції p12 та p13, та 2 експерименти з векторами p133 та p135. Вектор p12 так само, як і вектор p133, мав у своїй Т-ДНК гени *cp4 epsps* та *bar*, а вектор p13 так само, як і вектор p135, містив у своїй Т-ДНК гени *cp4 epsps* та *nptII*, тільки в іншому порядку по відношенню до правого плеча. Селекція трансгенних ліній проводилась на середовищах із гліфосатом, як описано вище. В експериментах з трансформації були задіяні наступні генотипи кукурудзи: PLS61, R₂PLS61×PLS61, PLS61×ДК232, ДК232×PLS61 та PLS61×ДК267.

Була проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсу кукурудзи гібридів F₁ PLS61×ДК232 та ДК232×PLS61 вектором p13 за описаною вище методикою. Загалом було опрацьовано 220 калюсів генотипу PLS61×ДК232 та 232 калюси гібрида ДК232×PLS61. Після селекції на середовищах для калюсогенезу 104 калюси гібрида PLS61×ДК232 та 108 калюсів генотипу ДК232×PLS61 були перенесені на регенераційне

середовище, яке містило 0,01 мМ гліфосату. На даному середовищі спостерігали позеленіння 15 калюсів генотипу PLS61×ДК232, що становить 14,4 % від усіх калюсів, перенесених на регенераційне середовище, та 20 калюсів генотипу ДК232×PLS61, що становило 18 % від перенесених на регенераційне середовище калюсів. Серед 15 морфогенних калюсних ліній генотипу PLS61×ДК232, для 8 спостерігали регенерацію пагонів (рис. 5.8). Одна рослина була відокремлена і висаджена в банку із безгормональним середовищем MS, яке містило 500 мг/л цефотаксиму. З листків цього регенеранта була виділена ДНК, аналіз якої методом ПЛР не виявив наявності в ній трансгенів. Для генотипу ДК232×PLS61 спостерігали регенерацію пагонів з однієї калюсної лінії. Регенерант був відокремлений і висаджений в банку для укорінення. При дослідженні методом ПЛР ДНК рослини, наявності трансгенів в ній не виявлено.



Рис. 5.8. Регенерація пагонів кукурудзи гібрида PLS61×ДК232 на селективному середовищі із гліфосатом.

Також була проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація векторами p12 та p13 калюсу генотипів PLS61, PLS61×ДК267, R₂PLS61. Частота утворення морфогенних калюсів та регенерації з них пагонів сильно різнилась залежно від експерименту. Так, наприклад, для ліній PLS61 та R₂PLS61 тільки 4 % та 8 % калюсів відповідно зеленіли на регенераційному середовищі після трансформації вектором p13. У жодного з них регенерації

не спостерігали. Водночас, в іншому експерименті з використанням вектора p12 частота утворення морфогенного калюсу гібрида R₂PLS61×PLS61 становила 36,8 %, а частота регенерації з калюсів по відношенню до всіх, висаджених на регенераційне середовище, була 7 % (рис. 5.9), 10 рослин були висаджені в банки для укорінення. Три лінії регенерантів було проаналізовано методом ПЛР на наявність трансгенів. Присутності трансгенів в рослинній ДНК не ідентифікували.

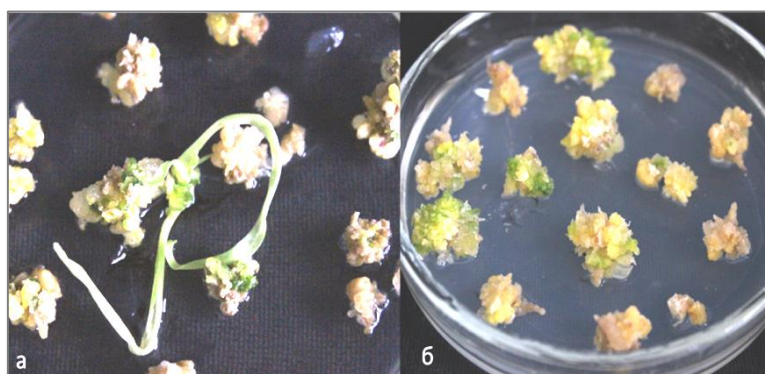


Рис. 5.9. Морфогенез калюсів гібридів R₂PLS61×PLS61 (а) та PLS61×ДК232 (б) на регенераційному середовищі із гліфосатом після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором p12.

Для гібридів PLS61×ДК232 та ДК232×PLS61 частота утворення морфогенних калюсів на селективному середовищі із гліфосатом була близько 10 %, проте, регенерація з калюсів генотипу PLS61×ДК232 відбувалася частіше (2,6 % до загальної кількості калюсів, висаджених на регенераційне середовище, 4 регенеранти) порівняно з генотипом ДК232×PLS61 (0,3 %, 1 регенерант), після трансформації вектором p12.

Тобто, підтверджено, що одними із найголовніших факторів, які впливають на позитивний результат з отримання трансгенних рослин кукурудзи є генотип вихідного матеріалу та векторна конструкція. Важливу роль для отримання потрібного результату відіграє регенераційний потенціал генотипу. Проте, це спостереження не завжди спрацьовує. Так, наприклад, в цьому конкретному випадку, частота регенерації вихідного калюсу на звичайному регенераційному середовищі становила 86,7 % для генотипу

ДК232×PLS61 і 26,3 % – для гібрида PLS61×ДК232, тоді як регенерацію рослин після трансформації спостерігали частіше з калюсу PLS61×ДК232.

5.2.2.1. Вплив оптичної щільності суспензії клітин агробактерії на частоту регенерації пагонів

Був проведений експеримент з вивчення впливу оптичної щільності клітин суспензії агробактерії, яку використовували, на частоту регенерації пагонів після трансформації (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Вплив оптичної щільності клітин агробактеріальної суспензії на частоту регенерації пагонів після трансформації

Оптична щільність клітин агробактерії, OD ₆₀₀	Регенераційне середовище						Висаджено регенерантів в банки, шт
	Висаджено калюсів		Морфогенних калюсів		Регенерація пагонів		
	шт	%	шт	%	шт	%	
0,3	132	46,2	31	23,5	4	3,03	4
0,4	192	66.2	11	5,7	2	1,04	1

Однакову кількість калюсів гібрида R₂PLS61×PLS61, який характеризується високою частотою регенерації (>75 %), обробляли бактеріальною суспензією, яка містила вектор p12, із оптичною щільністю 0,3 та 0,4 оп.од. (поглинання світла довжиною 600 нм). На регенераційне середовище було перенесено 132 калюси (46,2 % від загальної кількості калюсів) після трансформації бактеріальною суспензією клітин щільністю 0,3 оп.од. та 192 калюси (66,2 %) після трансформацією бактеріальною суспензією клітин зі щільністю 0,4 оп.од. Морфогенез через 6 тижнів культивування на регенераційному середовищі в умовах освітлення спостерігали для 5,7 % калюсів, що обробляли бактерією щільністю 0,4 оп.од., та 23,5 % калюсів для яких використовували агробактерію зі щільністю 0,3 оп.од. Регенерацію пагонів спостерігали для 3,03 % та 1,04 % висаджених на регенераційне середовище калюсів (рис. 5.10). Отже, кількість

рослин-регенерантів $R_2\text{PLS61} \times \text{PLS61}$, отриманих на селективних середовищах із гліфосатом, була більшою після використання агробактеріальної суспензії меншої щільності.

Методом ПЛР було проаналізовано на наявність трансгенів 4 лінії рослин-регенерантів, отриманих після трансформації суспензією *A. tumefaciens* щільністю 0,3 оп.од., та 1 регенерант після трансформації бактерією щільністю 0,4 оп.од. Трансгени в рослинній ДНК не виявлені.

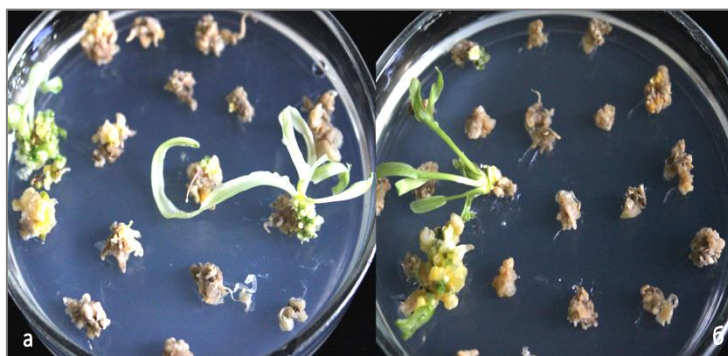


Рис. 5.10. Регенерація пагонів кукурудзи гібрида $R_2\text{PLS61} \times \text{PLS61}$ на селективному середовищі з гліфосатом після обробки калюсів суспензією агробактерій щільністю 0,3 оп.од. (а) та 0,4 оп.од. (б), яка містила вектор p12.

5.2.3. Аналіз ДНК тепличних рослин-регенерантів

Після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135 отримані укорінені регенеранти були перенесені в ґрунт. Загалом 30 рослин-регенерантів, індукованих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135, пересаджено в банки: 19 рослин генотипу $\text{PLS61} \times \text{ДК232}$, 9 рослин гібрида $\text{ДК232} \times \text{PLS61}$ і 2 рослини лінії PLS61 (рис. 5.11).

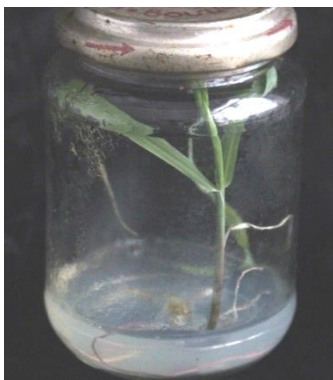


Рис. 5.11. Укорінена рослина-регенерант гібрида ДК232×PLS61, отримана після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації вектором pCB135.

Десять рослин гібрида PLS61×ДК232 та вісім рослин гібрида ДК232×PLS61 були висаджені в ґрунт (рис. 5.12).

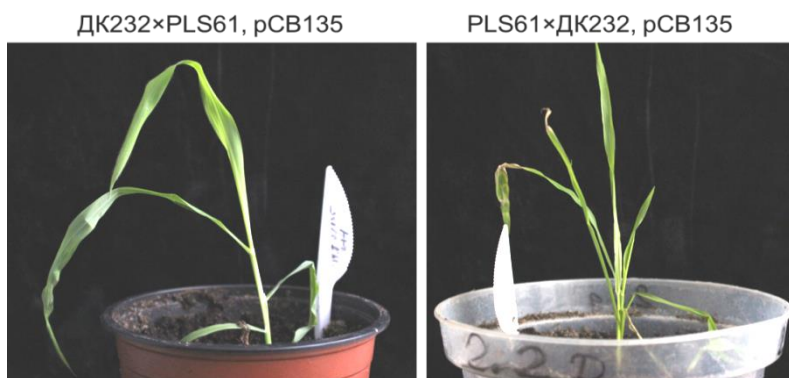


Рис. 5.12. Рослини-регенеранти кукурудзи, отримані після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації, в умовах ґрунту.

ДНК, виділена з листків 4-х тепличних рослин гібрида PLS61×ДК232 та 3-х тепличних рослин генотипу ДК232×PLS61, була проаналізована методом ПЛР на присутність трансгенів, проте вони не були виявлені в рослинній ДНК.

5.3. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи

Для трансформації використовували незрілі зародки кукурудзи 21 генотипу: 8 інбредних ліній, 10 гібридів F_1 та соматоклональні варіанти на основі гібридів F_1 (табл. 5.3). Донорні рослини кукурудзи вирощували у польових умовах. Незрілі зародки у віці 10–12 діб після запилення ізолювали

з донорних рослин, стерилізували та експлантували на живильне середовище для калюсогенезу (Нітовська та ін., 2012). Через 2–16 діб культивування незрілі зародки, на щитках яких почали розвиватися калюси, піддавали біолістичній трансформації. В експериментах використовували вектор рАНС25, який містить ген β -глюкуронідази *uidA*, та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *bar*, обидва під контролем промотора убіквітину кукурудзи.

Таблиця 5.3

Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи

Генотип	Кількість пострілів, шт	DIC*	Кількість регенерантів, шт	GUS-забарвлення	
				Калюс, кількість зародків, шт	Листки, кількість регенерантів, шт
PLS61	3	7	2	-	-
PLS61	2	9	45	-	6
RS15	5	12	1	-	-
ПРЖ5	2	8	1	-	-
ПРЖ5	2	16	0	1	-
P205	8	12	0	-	-
ДК744	3	13	0	-	-
ДК959	4	7	0	-	-
КС277	4	4	0	-	-
КГ232	4	9	0	-	-
PLS61♀×КГ232♂	2	9	1	-	-
PLS61♀×КГ232♂	4	10	0	1	-
PLS61♀×P205♂	4	8	0	-	-
PLS61♀×ДК744♂	2	7	0	-	-
PLS61♀×ДК744♂	4	9	3	1	-
PLS61♀×ДК959♂	2	5	0	-	-
PLS61♀×КП7♂	1	14	3	-	-
PLS61♀×ПРЖ5♂	2	15	4	-	-
ДК959♀×PLS61♂	6	9	6	5	1
КГ232♀×PLS61♂	2	11	0	-	-
ПРЖ5♀×PLS61♂	2	2	0	-	-
ДК744♀×PLS61♂	2	3	0	-	-
с.в. ДК304♀×PLS61♂	2	5	1	-	-
с.в. ДК304♀×PLS61♂	2	15	0	-	-
с.в. PLS61♀×ДК304♂	3	7	1	1	1
с.в. PLS61♀×ДК304♂	3	14	12	1	-
с.в. ДК675♀×Chi31♂	2	13	3	3	-
Загалом	82		82	13	8

Примітка: *DIC (days in culture) – кількість діб від експлантації незрілих зародків на середовище для калюсогенезу до проведення біолістичної обробки; с.в. – соматональний варіант.

Проведено три серії експериментів з біолістичної трансформації незрілих зародків при різних термінах культивування від експлантації на живильне середовище до проведення самої трансформації (DIC) (табл. 5.3).

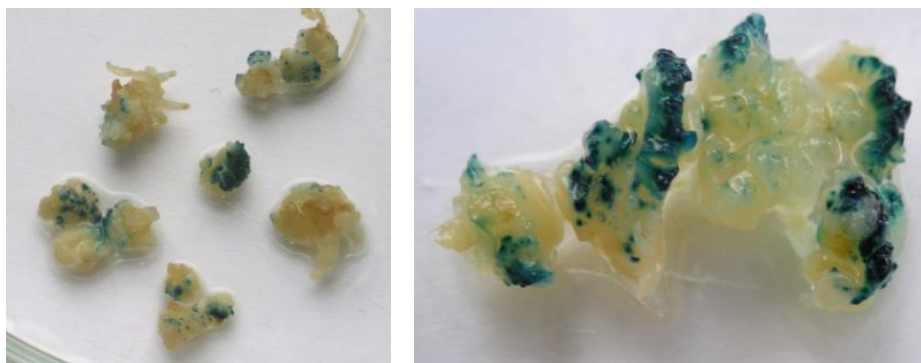


Рис. 5.13. Гістохімічне виявлення тимчасової експресії гена *uidA* після біолістичної трансформації, проведеної гарматою фірми Bio-Rad.

Через 4 доби після обстрілу проводили гістохімічний аналіз транзійтної експресії гена β -глюкуронідази в калюсних тканинах.

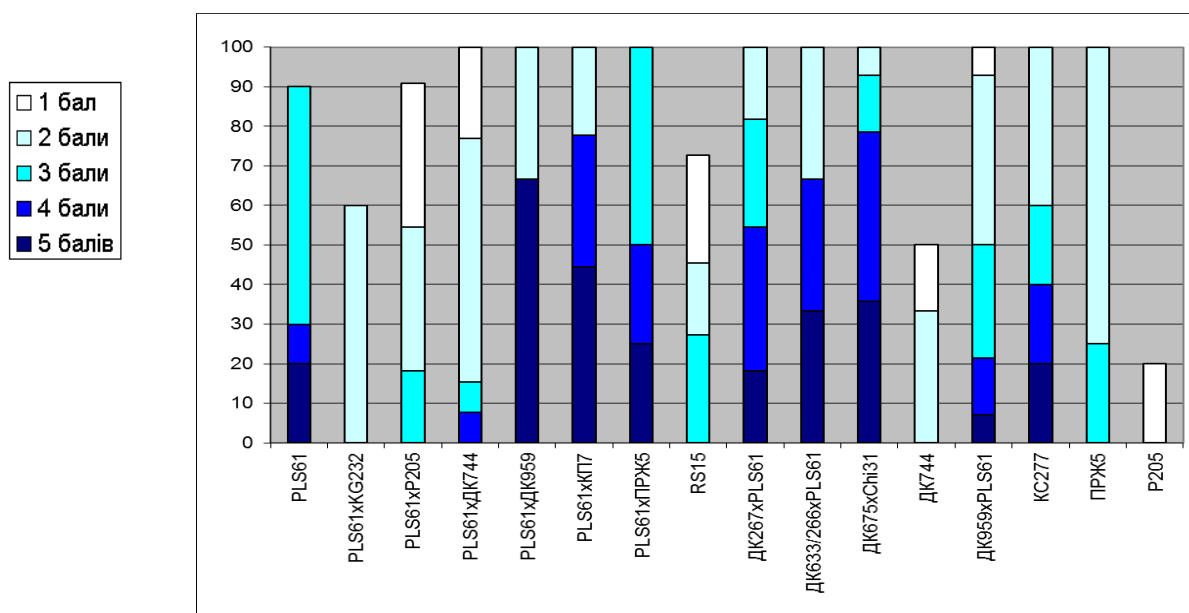


Рис. 5.14. Оцінка транзійтної експресії гена *uidA* після біолістичної трансформації різних генотипів кукурудзи.

За інтенсивністю блакитного забарвлення найкращими в експериментах з біолістичної трансформації виявились наступні генотипи

кукурудзи: інбредні лінії PLS61 і KC277 та гібриди F_1 ДК959♀×PLS61♂, PLS61♀×ДК959♂, PLS61♀×ПРЖ5♂, PLS61♀×КП7♂.

Через 1,5–2 місяці після трансформації для різних генотипів кукурудзи спостерігали регенерацію пагонів на селективному середовищі (рис. 5.15). Пагони відокремлювали від калюсу та висаджували в банки із селективним середовищем.

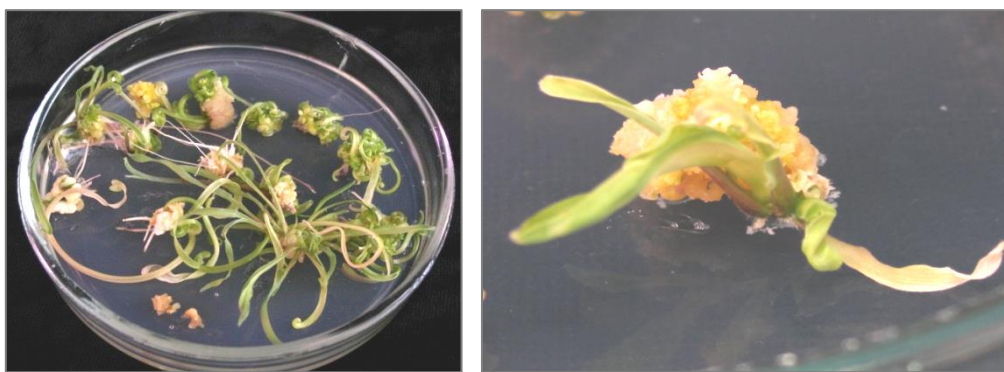


Рис. 5.15. Регенерація на селективному середовищі пагонів кукурудзи лінії PLS61 (ліворуч) та гібрида F_1 PLS61♀×ДК744♂ (праворуч).

Більшість рослин-регенерантів були чутливі до гербіциду, тоді як частина укорінювались та залишались зеленими на селективному середовищі (рис. 5.16).

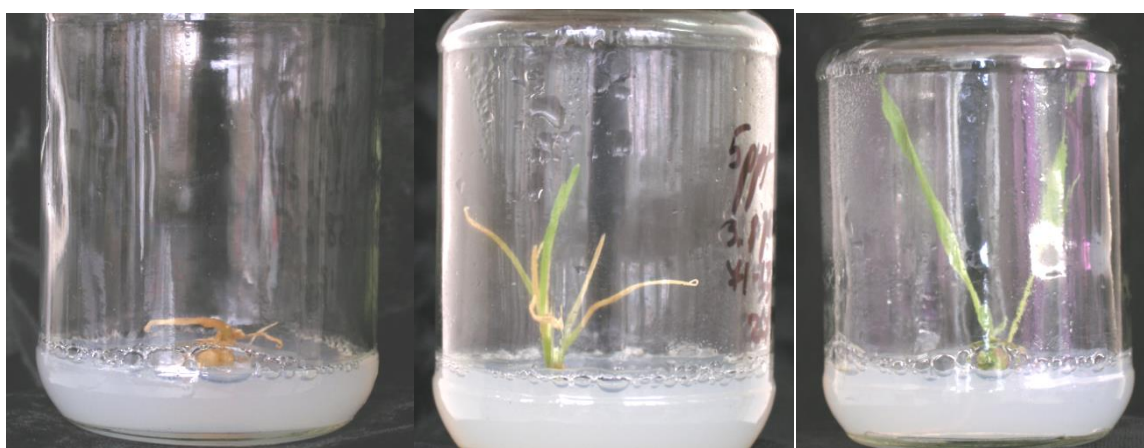


Рис. 5.16. Пагони кукурудзи на селективному середовищі.

Паралельно проводили гістохімічний аналіз на експресію гена *uidA* для частини рослинного матеріалу (листочки рослин-регенерантів і калюс), стійкого до фосфінотрицину. Гістохімічне фарбування на наявність

активності β -глюкуронідази показало, що синє забарвлення спостерігалось не по всій тканині, а на окремих ділянках, що може свідчити, або про замовчування експресії гена *uidA* в окремих ділянках, або про химерність одержаного рослинного матеріалу (рис. 5.17).



Рис. 5.17. Гістохімічне дослідження тимчасової експресії гена *uidA* в листку трансгенної кукурудзи.

Стійкий до фосфінотрицину калюс та листки рослин-регенерантів використовували для виділення загальної ДНК. Рослинну ДНК аналізували методом ПЛР на наявність послідовності трансгена *bar*. Показана присутність гена *bar* в рослинній ДНК стійкого до фосфінотрицину калюсу кукурудзи, який виявляв блакитне забарвлення при гістохімічному аналізі, а також для 6 ліній рослин-регенерантів (рис. 5.18).

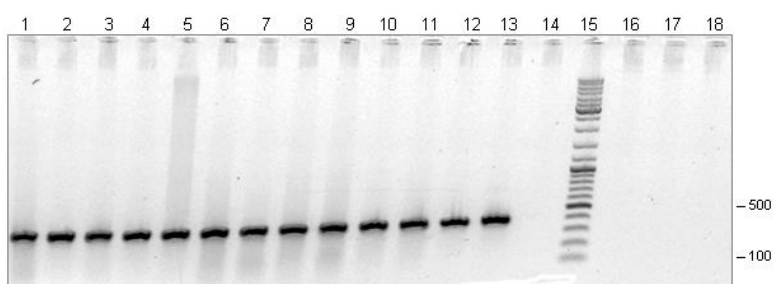


Рис. 5.18. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК калюсу та регенерантів кукурудзи з праймерами до гена *bar*. Доріжка 1 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 3); 2 – PLS61♀×ДК959♂ (к., л. 6); 3 – ДК959♀×PLS61♂ (к., л. 1); 4 – PLS61 (р., л. 17); 5 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 2); 6 – PLS61♀×ПРЖ5♂ (к., л. 1); 7 – PLS61 (р., л. 2); 8 – PLS61 (к., л. 3); 9 – PLS61 (к., л. 7); 10 – PLS61 (р., л. 1); 11 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 7); 12 – PLS61♀×ДК304♂ (р., л. 6); 13 – позитивний контроль; 14 – негативний контроль, без ДНК; 15 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; 16 – нетрансформована PLS61, негативний контроль; 17 – PLS61 (р., л. 8-1); 18 – PLS61♀×ДК744♂ (р., л. 3). Довжина очікуваного фрагмента – 411 п.н. Скорочення: к. – калюс; р. – рослина; л. – лінія.

Результати ПЛР свідчать про трансгенну природу одержаних рослин. Цікаво, що у нашому дослідженні спостерігається певна кореляція між рівнями транзійентної експресії β -глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи.

Встановлено, що найкращим для трансформації рослинним матеріалом були незрілі зародки з калюсами, які до обстрілу культивувалися 9 діб. У проведених експериментах з отримання стабільних трансформантів кукурудзи методом біолистичної трансформації найкращими виявились інбредна лінія PLS61 та гібриди F_1 PLS61♀×ДК744♂, PLS61♀×ДК304♂ і ДК959♀×PLS61♂.

В результаті проведених експериментів з біолистичної трансформації вектором рАНС25 були отримані стійкі до фосфінотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляли активність ферменту β -глюкуронідази. Аналіз методом ПЛР показав наявність гена *bar* у ДНК 6 ліній рослин-регенерантів, що свідчить про трансгенну природу одержаних рослин. Серед 21 генотипу кукурудзи, які створені та вирощуються на території України, були відібрані 4 генотипи, найбільш компетентні для біолистичної трансформації. Для двох регенерантів отримане T_1 та T_2 насіннєве покоління. Методом ПЛР підтверджено присутність гена *bar* серед T_2 нащадків трансгенної кукурудзи (рис. 5.19).

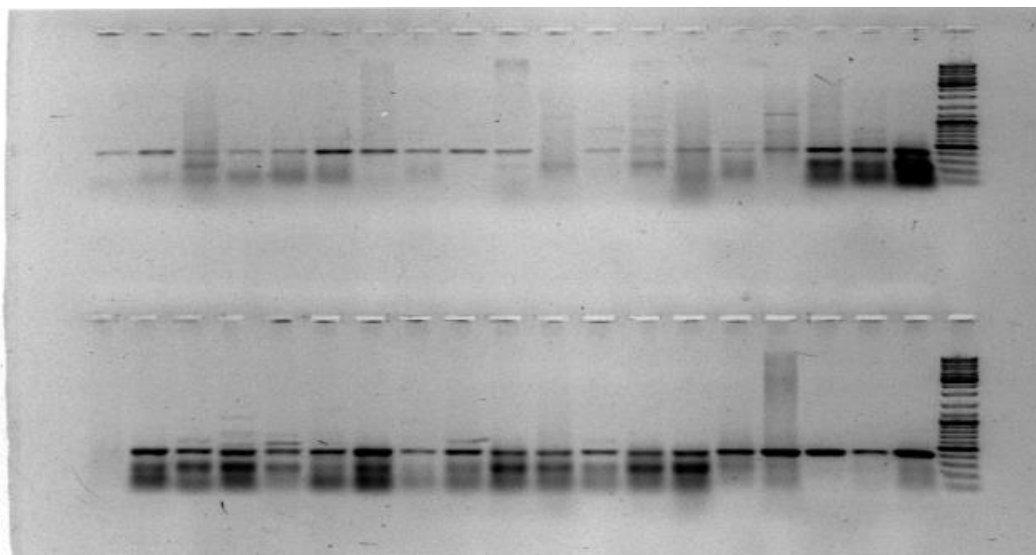


Рис. 5.19. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК рослин T_2 кукурудзи з праймерами до гена *bar*. Доріжки 1–10 та 12–18 нащадки регенеранта PLS61♀×ДК633/266♂. Доріжки 20–39 нащадки регенеранта PLS61.

5.4. Морфобіологічні особливості трансформантів кукурудзи в поколіннях T_0 – T_6

Одним із широко використовуваних у сільському господарстві гербіцидів є «Баста» – контактний гербіцид широкого спектра дії, діюча речовина якого – глюфосинат амонію являє собою еквімолярну, рацемічну суміш D- та L-ізомерів фосфінотрицину. Фосфінотрицин інгібує фермент глютамінсинтазу, який відіграє ключову роль в асиміляції амонію і регуляції метаболізму азоту в рослині. Стійкість трансгенних рослин до фосфінотрицину забезпечується за рахунок експресії ферменту фосфінотрицинацетилтрансферази, який кодується геном *bar* із геному грам-позитивної бактерії *Streptomyces hygroscopicus*. Незважаючи на актуальність питання оцінки трансформантів за комплексом фенологічних параметрів, до цього часу морфобіологічний аналіз трансгенних рослин протягом декількох поколінь практично не проводився. У зв'язку з цим, метою роботи було охарактеризувати морфобіологічні особливості трансформантів кукурудзи в поколіннях T_0 – T_6 . Як матеріал дослідження використовували трансформанти, отримані з вихідного гібрида кукурудзи PLS61×ДК633266, батьківські лінії

якого відносяться до зародкової плазми PLS61 (лінія PLS61) та зародкової плазми Ланкастер (лінія ДК633266).

Рослина T_0 , регенерована з калюсної тканини гібрида PLS61×ДК633266, була запилена пилом лінії Ланкастер ДК633266. В результаті отримано 40 насінин із зародками покоління T_1 , генотип яких $T_1:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]$. Частину насіння T_1 було висіяно у вегетаційних посудинах. На рослинах T_1 отримано насіння від самозапилення із зародками $T_2:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]1сз$, де 1сз – номер самозапилення (2079 шт). В наступних поколіннях, на рослинах T_2 – T_6 насіння отримували тільки шляхом самозапилення. Генотипи зародків цього насіння і рослин, які формувалися при його проростанні, відповідно становили $T_{3-6}:[T_0(PLS61 \times ДК633266) \times ДК633266]2-5сз$.

Для рослин поколінь T_2 і T_3 вивчали ріст та розвиток за чотирма варіантами досліду: 1 – рослини, які не є потомками генетично трансформованих рослин, необроблені гербіцидом «Баста»; 2 – рослини, які не є потомками генетично модифікованих рослин, оброблені гербіцидом «Баста»; 3 – трансформанти, які містили ген *bar*, необроблені гербіцидом «Баста»; 4 – трансформанти, які містили ген *bar*, оброблені гербіцидом «Баста».

Таблиця 5.4

**Схожість насіння трансформантів поколінь T_2 і T_3 генотипу
PLS61×ДК633266**

Рослини	Варіант*/покоління		Висіяно насіння на ділянці, шт	Схожість, %*
Нетрансформовані (контроль)	1	R_2	35	77,1±14,4
	2	R_2	35	74,3±15,0
Трансформанти (дослід)	3	T_2	32	75,0±15,6
		T_3	50	50,0±14,3
	4	T_2	309	52,4±5,7
		T_3	341	28,2±4,9

Примітка. * – тут і далі варіант 1 – рослини-регенеранти, необроблені гербіцидом «Баста»; 2 – рослини-регенеранти, оброблені гербіцидом «Баста»; 3 – трансформанти за геном *bar*, необроблені гербіцидом «Баста»; 4 – трансформанти за геном *bar*, оброблені гербіцидом «Баста».

Як контроль використовували рослини-регенеранти покоління R_2 генотипу (PLS61×ДК633266)×ДК633266, отримані при культивуванні калюсів гібрида PLS61×ДК633266. В табл. 5.4 наведено схожість насіння біотехнологічних рослин поколінь T_2 і T_3 .

Порівняно з контрольними рослинами трансформанти мали значно меншу схожість, причому в T_3 вона знижувалася навіть у порівнянні з T_2 . Схожість насіння покоління T_2 більш вирівняна і варіювала між сім'ями у діапазоні 17,2–67,6 %. В поколінні T_3 схожість насіння варіювала між сім'ями в ширшому діапазоні 0–73,5 %.

Таблиця 5.5

Вживаність трансформантів кукурудзи поколінь T_2 та T_3 за дії гербіциду «Баста» (1 г/л) (вихідний генотип PLS61×ДК633266)

Рослини	Варіант/ покоління		n	На 20-ту добу після обробки гербіцидом			На кінець вегетаційно- го періоду
				частота, %*	середній бал†	бал 4–5, %††	частота, %*
Нетрансформовані (контроль)	1	R_2	27	100	5,0	100	100
	2	R_2	26	0	0	0	0
Трансформанти (дослід)	3	T_2	24	100	5,0	100	100
		T_3	25	100	4,0	72,0±18,0	100
	4	T_2	162	64,5±8,2	1,8	19,8±6,3	46,4±8,5
		T_3	96	80,0±9,5	3,3	30,2±9,4	67,6±11,2

Примітка. n – у варіантах 1,3 кількість рослин на ділянці, у варіантах 2,4 – кількість рослин, оброблених гербіцидом «Баста» (1 г/л); *у варіантах 1,3 частота виживаності розраховувалася від кількості рослин на ділянці, у варіантах 2,4 – від кількості рослин, оброблених гербіцидом, † – тут і далі за 5-бальною шкалою: 0 балів – загибель рослин, 5 балів – максимальна виживаність, †† – процентне відношення кількості рослин з балом виживаності 4–5, до кількості рослин, оброблених гербіцидом.

Аналіз реакції рослин на обробку гербіцидом «Баста» (34 доби після появи сходів та 20 діб після обробки дослідних ділянок гербіцидом) показав, що нетрансформовані рослини-регенеранти покоління R_2 без обробки гербіцидом були неушкоджені, а такі ж рослини після обробки гербіцидом – повністю загинули. Трансформанти покоління T_2 після обробки гербіцидом виглядали стійкими та умовно стійкими з різним ступенем пошкодження. У

варіанті після обробки гербіцидом рослини-регенеранти R_2 повністю загинули, а трансформанти T_3 загалом вижили, хоча і продемонстрували різний ступінь стійкості до дії гербіциду. В табл. 5.5 наведено підсумкові дані стосовно виживаності рослин кукурудзи на 20-ту добу після обробки гербіцидом «Баста» (34-а доба від появи сходів).

Як видно з табл. 5.5, найвищий бал виживаності за 5-бальною шкалою мали контрольні рослини (варіант 1) та трансформанти, не оброблені гербіцидом (варіант 3). Рослини покоління T_3 мали 4-бальну оцінку виживаності. Нетрансформовані рослини, оброблені гербіцидом, загинули протягом тижня після обробки. Серед трансформантів, оброблених гербіцидом, виживаність на рівні 4–5 балів мали 19,8 % рослин T_2 та 30,2 % рослин T_3 . Загалом, середній бал виживаності для рослин T_2 коливався в діапазоні 1,3–2, а частка рослин на кожній ділянці, які переносили вплив гербіциду і мали бал виживаності 4–5, коливалася в діапазоні 6,7–52,4 %. Для рослин T_3 після обробки гербіцидом середній бал виживаності дещо збільшився і знаходився в діапазоні 1,5–3 бали. Збільшилася і частка рослин в поколінні T_3 , яка після обробки гербіцидом мала виживаність на рівні 8,0–84,6 %. Найбільшу кількість рослин з виживаністю 84,6 % показала сім'я № 27, що свідчить про успішний добір на селективному фоні у попередніх поколіннях та вірогідне накопичення трансгену в геномі рослин в двох циклах гомозиготизації шляхом самозапилення. Насіння від самозапилення сім'ї № 27, яка пройшла відбір на селективному фоні у ґрунті та була морфологічно схожа на батьківську лінію ДК633266, було використано в наступному році для вирощування покоління T_4 .

Кількісна оцінка рослин за виживаністю протягом всього вегетаційного періоду показала, що в контрольних варіантах дослідів 1 та 3 (без обробки гербіцидом) протягом вегетаційного періоду зберігаються всі рослини на ділянці. В контрольному варіанті 2, де вирощувалися нетрансформовані рослини, після обробки гербіцидом спостерігалася загибель всіх рослин. Для варіанта 4 за дії гербіциду через 20 діб після обробки вижили 64,5 % рослин

покоління T_2 та дещо більше 80 % рослин T_3 . Післядія гербіциду проявлялася не тільки в загибелі рослин до 20-ї доби після обробки, а і у пригніченні розвитку протягом всього вегетаційного періоду. Так, сумарно за вегетаційний період серед оброблених гербіцидом рослин в поколінні T_2 загинуло 53,6 % рослин, а в поколінні T_3 – лише 32,4 % рослин.

Таблиця 5.6

Вплив обробки гербіцидом «Баста» на тривалість міжфазних періодів у трансформантів кукурудзи поколінь T_2 і T_3 (вихідний генотип PLS61×ДК633266)

Рослини	Варіант/ покоління		n	Сходи-цвітіння			
				волотей,		качанів,	
				діб	V, %	діб	V, %
Нетрансформовані (контроль)	1	R_2	10	51,9±0,6	2,1	52,9±0,7	2,6
	2	R_2	-	-	-	-	-
Трансформанти (дослід)	3	T_2	24	53,5±1,6	5,9	55,0±1,9	6,9
		T_3	25	59,3±2,1	7,1	61,4±2,1	6,9
	4	T_2	72	64,2±2,1	6,3	67,2±3,1	9,1
		T_3	49	63,5±3,5	11,0	66,2±4,0	11,9

Примітка. n – кількість досліджених рослин, шт; V, % – коефіцієнт варіації; рослини варіанту 2, нетрансформовані і оброблені гербіцидом «Баста», загинули протягом тижня після обробки у фазі сходів.

Як видно з табл. 5.6, у трансформантів поколінь T_2 і T_3 , які були оброблені гербіцидом (варіант 4), збільшився термін від сходів до цвітіння волотей та качанів порівняно з нетрансформованим та необробленим контролем (варіант 1) та необробленими трансформантами (варіант 3). У варіанті 4 між рослинами покоління T_2 і T_3 спостерігалась підвищена варіабельність за досліджуваними ознаками, що призвело до зростання відповідних коефіцієнтів варіації і опосередковано свідчить про розщеплення всередині популяції рослин T_2 і T_3 при самозапиленні. Розрив в термінах цвітіння волотей і качанів в поколіннях R_2 , T_2 та T_3 в цілому по досліді становив 1–5 діб. У рослин варіанту 4 в обох поколіннях тривалість розриву (відповідно 3,3±1,5 і 2,9±1,0 діб) достовірно збільшилася по відношенню до нетрансформованого, необробленого контролю (варіант 1 – 1,1±0,5 діб) та виявила тенденцію до збільшення порівняно з необробленими гербіцидом

трансформантами (відповідно в $T_2 - 1,6 \pm 0,8$ діб та $T_3 - 2,1 \pm 1,0$ діб). Між рослинами всіх варіантів спостерігалась значна варіабельність за показником тривалості розриву цвітіння волотей і качанів.

Дослідження висоти рослин (табл. 5.7) T_2 і T_3 показало, що у покоління T_2 мало пригнічений ріст і достовірно менша висота рослин трансформантів, підданих обробці гербіцидом (варіант 4), ніж у нетрансформованого необробленого контролю (варіант 1) та трансформантів, необроблених гербіцидом (варіант 3).

Таблиця 5.7

Вплив обробки гербіцидом на висоту рослин (см)

Покоління	Рік спостережень	Варіант			
		1	2	3	4
T_2	2014	$160,8 \pm 2,4$	-	$155,2 \pm 10,4$	$111,2 \pm 13,7$
T_3	2014	$160,8 \pm 2,4$	-	$125,3 \pm 8,4$	$114,5 \pm 10,9$
T_6	2017	$143,9 \pm 5,6$	-	$166,9 \pm 4,5$	$160,9 \pm 4,6$

В поколінні T_3 відмічено зменшення висоти рослин (варіант 4) порівняно з нетрансформованими необробленими рослинами (варіант 1), але вплив гербіцидної обробки на висоту рослин порівняно з необробленими трансформантами (варіант 3) не встановлений. Спостереження за висотою рослин в даному експерименті виявило і такий цікавий факт, як достовірне зменшення висоти рослин в поколінні T_3 порівняно з поколінням T_2 у необроблених гербіцидом трансформантів у варіанті 3 при майже однаковому коефіцієнті варіації (відповідно 13,2 % і 13,3 %). Таке зменшення є закономірним результатом і добре відоме в поколіннях рослин при самозапиленні кукурудзи. Разом з тим, аналогічне порівняння висоти рослин в поколіннях трансформантів T_2 і T_3 після дії гербіциду (варіант 4) показує відсутність істотної різниці за висотою рослин та підвищення коефіцієнту варіації (відповідно 24,4 % і 18,7 %). Тобто, сильніше варіювання ознаки на фоні стресу не дозволяє виявити зміну висоти рослин при інцухтуванні і відділити спадкове зменшення висоти від адаптивної реакції на стрес.

В T_6 поколінні спостерігали виживаність на рівні 100 % після обробки трансформантів у фазі сходів, що вказує на гомозиготний стан трансгена в рослинах. У 2017 р. середні значення висоти рослин-трансформантів покоління T_6 без гербіцидної обробки (варіант 3) та за умов гербіцидної обробки (варіант 4) достовірно не розрізнялися, що опосередковано свідчить про стабілізацію рослинного геному після введення чужинного гена в ряду поколінь. Рослини варіантів 3 і 4 за морфологією були подібні до батьківської лінії ДК633266, а контроль (варіант 1) – до батьківської лінії PLS61.

Представлений аналіз морфобіологічних особливостей рослин-трансформантів загалом свідчить і про явища, які зазвичай супроводжують інцухтування і підвищення гомозиготності – зниження висоти рослин, розщеплення на окремі сім'ї, диференціацію сімей за морфологічними ознаками тощо.

Таким чином, проведена морфобіологічна оцінка трансформантів, які несуть чужорідний ген *bar* в поколіннях T_0 – T_6 дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку. Нащадки трансформантів мають знижену схожість як в поколінні T_2 , так і в поколінні T_3 . За фенологічними показниками та висотою трансформанти, не оброблені гербіцидом в поколінні T_2 , істотно не відрізняються від нетрансформованих, а в поколінні T_3 виявляють збільшення тривалості міжфазних періодів, розриву в цвітінні чоловічих та жіночих суцвіть, а також пригнічення росту, що призводить до зменшення висоти рослин. Дослідження морфобіологічних показників у трансгенних рослин, показало, що вони мають деяке відставання в розвитку, зокрема, за термінами цвітіння чоловічих і жіночих суцвіть, за висотою рослини, що може розглядатися як звичайна реакція на дію стресового чинника, або як наслідок вбудовування трансгена в рослинний геном. Між рослинами всередині сімей T_2 та T_3 спостерігається більша варіабельність за дослідженими ознаками, ніж в контролі. Це дозволяє припустити наявність рослин з різним ступенем

стійкості до гербіциду. Частота виживаності рослин T_6 за гербіцидної обробки становила 100 %, висота рослин трансформантів без гербіцидної обробки та за умов гербіцидної обробки достовірно не розрізнялася, що вказує на вірогідне накопичення трансгену в геномі рослин в п'яти циклах самозапилення та успішний добір на селективному фоні, а також стабілізацію рослинного геному в ряду поколінь після введення трансгенів.

На підставі проведених досліджень нами запропоновані способи отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом біолістичної трансформації гібридних зародків F_1 та відбору генотипів кукурудзи, компетентних до біолістичної трансформації.

Спосіб отримання трансгенних ліній кукурудзи шляхом біолістичної трансформації відрізняється тим, що трансформації піддають калюсну тканину, отриману не з гомозиготних зародків, а з гібридних зародків F_1 , які мають вищий, ніж у ліній, рівень калюсогенезу і регенерації, а також не використовують дію селективного агента на слабо адаптовані до умов *in vivo* асептичні регенеранти T_0 , що зменшує втрати рослин, а відбір ведуть в умовах закритого ґрунту на фоні селективного тиску з одночасним ПЛР-аналізом ДНК рослин з метою отримання трансгенних ліній. Відібрані таким чином рослини самозапилюють. Відбір на селективному фоні та самозапилення повторюють у поколіннях T_1 – T_5 до отримання трансгенних ліній.

Спосіб відбору генотипів кукурудзи, компетентних до біолістичної генетичної трансформації, полягає в тому, що через чотири доби після трансформації проводять дослідження транз'єнтної експресії гена β -глюкуронідази в калюсній тканині, отриманій на незрілих зародках, за інтенсивністю синього забарвлення та площею калюсу, яку воно займає. Перевагами даного способу є підвищення ефективності роботи дослідників, заощадження часу та витрат для отримання трансгенних рослин кукурудзи завдяки швидкому відбору найбільш компетентних до біолістичної генетичної трансформації генотипів кукурудзи.

Підсумовуючи слід зазначити, що нами оптимізовані окремі етапи протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Виділений гібрид R₂PLS61×PLS61 з високою та тривалою регенераційною здатністю. Показано перспективність використання гліфосату в концентрації 0,01 мМ для добору трансгенних форм кукурудзи. Встановлено позитивний ефект антибіотика цефотаксиму на регенераційну здатність калюсів кукурудзи, отриманих з незрілих зародків, та негативний – фосфінотрицину та паромоміцину. Виявлено, що кількість регенерантів, отриманих на селективних середовищах із гліфосатом, більша при щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,3 оп.од. порівняно з 0,4 оп.од. За допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* отримано трансгенні рослини кукурудзи, які несуть цільовий ген *cp4 epsps*, продукт якого надає стійкості до гліфосату.

Також оптимізовані окремі етапи протоколу біолістичної трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Встановлено, що найкращим для трансформації рослинним матеріалом є незрілі зародки з калюсами, які до обстрілу культивувалися 9 діб. Серед 21 генотипу кукурудзи, які створені та вирощуються на території України, були відібрані 4 генотипи найбільш компетентні до біолістичної трансформації. Отримано стійкі до фосфінотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляється активність ферменту β-глюкуронідази. Встановлена певна кореляція між рівнями транз'єнтної експресії β-глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи.

Проведена морфобіологічна оцінка трансформантів, які несуть чужорідний ген *bar*, в поколіннях T₀–T₆ дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку. Частота виживаності рослин T₆ за гербіцидної обробки становила 100 %, висота рослин трансформантів без гербіцидної обробки та за умов гербіцидної обробки достовірно не розрізнялася, що вказує на вірогідне

накопичення трансгену в геномі рослин в п'яти циклах самозапилення та успішний добір на селективному фоні, а також стабілізацію рослинного геному в ряду поколінь після введення трансгенів.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи в культурі *in vitro* методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації;
- експериментально доведена ефективність використання гібрида R₂PLS61×PLS61 та щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,3 оп.од. для підвищення регенерації за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи;
- встановлено, що найкращим матеріалом для біолістичної трансформації кукурудзи є незрілі зародки з калюсами, які до обстрілу культивувалися 9 діб, та відібрано генотипи, найбільш компетентні до даного способу трансформації;
- отримано трансгенні рослини кукурудзи, стійкі до гліфосату та фосфінотрицину;
- виявлена певна кореляція між рівнями транзійентної експресії β-глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи.

Публікації пошукача, видані за даним розділом:

1. Nitovska I.O., Abraimova O.Y., Duplij V.P., Derkach K.V., Satarova T.M., Rudas V.A., Cherchel V.Yu., Dziubetskyi B.V., **Morgun B.V.**, 2019. Application of beta-glucuronidase transient expression for selection of maize genotypes competent for genetic transformation. *Cytology and Genetics*, 53(6), pp. 451–458.

2. Деркач К.В., Абраїмова О.Є., Черчель В.Ю., Дзюбецький Б.В., **Моргун Б.В.**, Нітовська І.О., Сатарова Т.М., 2017. Морфобіологічні особливості рослин-трансформантів кукурудзи. *Зернові культури*. 1(2), С. 232–241.

3. Нітовська І.О., Комарницький І.К., **Моргун Б.В.**, 2017. Селекція на гліфосаті трансгенних калюсних ліній кукурудзи генотипів, районованих в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 20, С. 237–242.

4. Нітовська І.О., Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., Шаховський А.М., **Моргун Б.В.**, 2014. Біолістична трансформація незрілих зародків кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 15, С. 112-117.

5. Нітовська І.О., Дуплій В.П., Рудас В.А, Абраїмова О.Є., Сатарова Т.М., **Моргун Б.В.** Оптимізація умов трансформації калюсних ліній кукурудзи за допомогою детекції транзїєнтної експресії гена бета-глюкуронїдази. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС. - Київ: Логос. - 2012. - Т. 4. - С. 587-592.

6. Нітовська І.О., **Моргун Б.В.**, Дуплій В.П., Деркач К.В., Черчель В.Ю., Сатарова Т.М. Спосіб відбору генотипів кукурудзи, компетентних до біолістичної генетичної трансформації, за допомогою дослідження транзїєнтної експресії гена бета-глюкуронїдази / Заявка № u 2019 10557 на деклараційний патент України **на корисну модель**; МПК (2020.01) А01Н 4/00 А01Н 1/00; заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Державна установа Інститут зернових культур Національної академії аграрних наук України. Заявл. 23.10.2019.

7. Абраїмова О.Є., Нітовська І.О., **Моргун Б.В.**, Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Деркач К.В., Сатарова Т.М. Спосіб трансформації та селекції кукурудзи / Патент України **на винахід** № 117974; Заявка номер а201700622; МПК (2018.01) А01Н 4/00; А01Н 1/04 (2006.01); А01Н 6/46 (2018.01). Заявники та патентовласники Державна установа Інститут зернових культур НААН України й Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Заявл. 25.10.2018. Бюл. № 20.

РОЗДІЛ 6

МОНІТОРИНГ РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИН НА ПОЛЯХ ТА У ТОРГІВЕЛЬНІЙ МЕРЕЖІ

Несанкціоноване занесення трансгенних рослин на територію України є важливою проблемою, яка потребує детального аналізу і вирішення. Українська система регулювання ГМО відносно нова і недосконала. Закон України «Про державну систему біобезпеки при створенні, випробуванні, транспортуванні та використанні генетично модифікованих організмів» був прийнятий 30 травня 2007 року. Необхідно зазначити, що сьогодні в Україні не існує єдиного державного органу, який би займався питаннями ГМО. Загалом, в Україні заяви на реєстрацію п'яти сільськогосподарських культур були подані ще в 1997–1998 рр.: Вт картопля від компанії Монсанто (3 сорти), Вт кукурудза від Сінгента та Монсанто, ріпак від Байєр та Roundup Ready кукурудза компанії Монсанто. Згадані вище сорти сільськогосподарських рослин пройшли випробування, але жоден з них не отримав остаточного схвалення та не зареєстрований в Україні. На даний час в Україні ще не зареєстровано жодного ГМО.

Верховною Радою України 17 грудня 2009 року було прийнято Закон України № 1778-VI «Про внесення змін до Закону України «Про безпечність та якість харчових продуктів» щодо інформування громадян про наявність у харчових продуктах генетично модифікованих організмів (ГМО)» та Закон України № 1779-VI «Про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо надання інформації про вміст у продукції генетично модифікованих компонентів», який набрав чинності з 7 березня 2010 року. Зазначеними законами передбачено обов'язкове маркування харчових продуктів щодо наявності чи відсутності в них ГМО, що повинно відображатися на етикетці написом «З ГМО» чи «Без ГМО» відповідно.

Оскільки жодна ГМ культура в Україні офіційно не зареєстрована, то їх ввезення в Україну та культивування є незаконними. За оцінками експертів від 50 % до 80 % сої, що вирощується в Україні, є генетично модифікованою. Офіційні дані з цього приводу відсутні. Тому сьогодні в державі існує проблема безконтрольного розповсюдження трансгенних рослин на полях та продуктів їх переробки в торгівельній мережі. Відповідно до цього необхідно створити надійні та специфічні системи виявлення та моніторингу ГМО в Україні. У зв'язку з потребою масового скринінгу зразків на присутність штучних генетичних конструкцій розробка швидких та дієвих методів їх детекції і моніторинг поширення таких організмів на полях та продуктів їх переробки в торгівельній мережі є актуальною задачею.

6.1. Виявлення трансгенної кукурудзи

Метою роботи було проведення моніторингу наявності трансгенної кукурудзи в Україні та розробка нової вдосконаленої методики детекції трансформаційних подій на основі полімеразної ланцюгової реакції. Ступінь розповсюдження трансгенних ліній кукурудзи (MON810, Bt176, GA21, NK603) на теренах України визначали методом класичної ПЛР, яка використовується для детекції цих трансформаційних подій. Предметом дослідження були гени стійкості до шкідників та гербіцидів. Розроблена методика застосовується у відділі молекулярної генетики ІКБГІ НАН України для детекції трансформаційних подій кукурудзи, що вирощується в Україні. Результати моніторингу наявності ГМ-кукурудзи на території України дають підстави для прийняття управлінських рішень щодо контролювання ринку сільськогосподарської продукції.

6.1.1. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційної події MON810

Стійкість до комах детермінується інсектицидним токсином Cry1Ab ґрунтової бактерії *Bacillus thuringiensis*. Одним із запатентованих носіїв цієї ознаки є трансгенна лінія компанії Монсанто, так звана трансформаційна подія MON810 (Кверчи, Маццара, 2006). Досліджували п'ятдесят зразків насіння харчової кукурудзи, зібрані у торгівельній мережі міста Києва та селекційних колекціях. Для точного визначення наявності MON810-специфічних послідовностей у загальній ДНК зразків застосовували ампліфікацію ПЛР (Теликов, 2006) з двома парами гніздових праймерів (Курочкин и др., 2010).

Використовували такі пари праймерів: *mg1-mg2* та *mg3-mg4*. Вони були сконструйовані для специфічного виявлення касети, що містить *E35S* промотор/*hsp70*екзон-інтрон за допомогою гніздового метода ПЛР (Zimmermann et al., 2010). Дана генна конструкція є специфічною для лінії кукурудзи MON810. Зовнішні праймери *mg1-mg2* гібридизуються з послідовністю промотора *E35S* та з ділянкою інтрона 1 гена білка теплового шоку *hsp70*, відповідно, водночас як внутрішні праймери *mg3-mg4* комплементарні послідовності ДНК *E35S* промотора та ділянці екзона 1 гена *hsp70*, відповідно. Як показано на рис. 6.1, два зовнішніх праймери *mg1-mg2* беруть участь в утворенні фрагмента ДНК довжиною 401 п.н., а праймери *mg3-mg4* ампліфікують відрізок довжиною в 149 п.н.

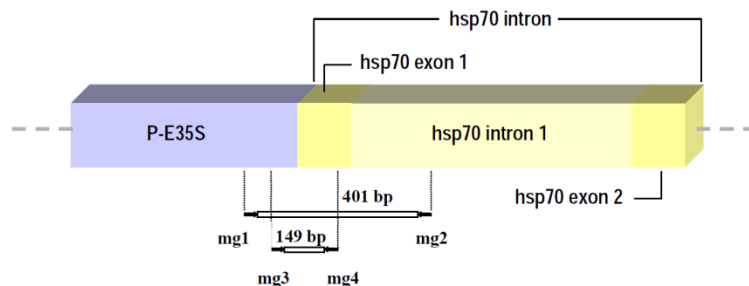


Рис. 6.1. Схематичне зображення частини касети кукурудзи лінії MON810 (включає підсилений *CaMV* 35S промотор та *hsp70* інтрон кукурудзи) та відносне розміщення праймерів *mg1*, *mg2*, *mg3*, *mg4* (Кверчи, Маццара, 2006).

Спочатку проводили ампліфікацію з першою парою праймерів *mg1* та *mg2*. З усіх досліджуваних зразків позитивні сигнали були виявлені лише в двох – під номерами 18 та 30. На рис. 6.2 наведена електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи з праймерами *mg1* та *mg2*. За наявності специфічної смуги після першої ПЛР використовували «гніздовий» варіант ПЛР (Huang, Cloutier, 2007) з парою внутрішніх праймерів *mg3* та *mg4* (рис. 6.3). Обидва позитивні зразки було сиквеновано. Нуклеотидні послідовності співпали на 99 %. В майбутньому достатньо подвійної гніздової ампліфікації, що швидше і простіше здійснити.

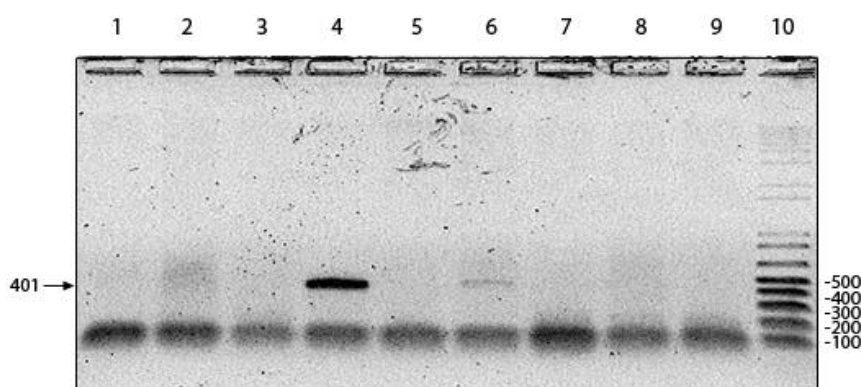


Рис. 6.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи з праймерами *mg1* та *mg2*: доріжки 1–8 зразки № 27–34; 9 – негативний контроль; 10 – маркер молекулярної маси 1 kb Plus DNA Ladder.

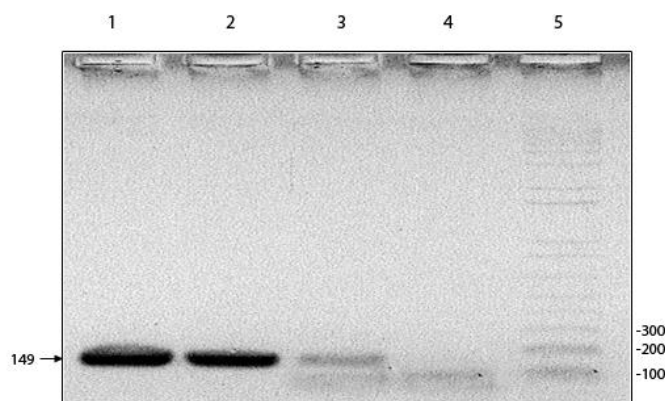


Рис. 6.3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи з праймерами *mg3* та *mg4* («гніздовий» ПЛР): доріжки 1, 2 – зразки № 18, 30, відповідно; 3 – позитивний контроль; 4 – негативний контроль; 5 – маркер 1 kb Plus DNA Ladder.

Як відомо, всі виробники реактивів для ПЛР радять додавати в реакційну суміш ДНК у кількості 100 нг/мкл для одержання достовірних результатів (Somma, 2006). Нами встановлена мінімальна кількість ДНК, достатня для проведення реакції. Для досліду був обраний зразок № 30, що вже раніше ампліфікувався з зеїновими праймерами і дав чітко позитивний сигнал. В декількох пробірках було виконано розведення ДНК до концентрації 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 нг/мкл і внесено в реакційну суміш. Ампліфікацію проводили за класичною програмою. На рис. 6.4 наведено зображення результатів електрофорезу розділення продуктів ампліфікації зразка № 30 з праймерами *ZEIN4* та *ZEIN3* за різних концентрацій ДНК. Отже, можна зробити висновок, що для одержання достовірних результатів проведеної ПЛР достатньо вносити в реакційну суміш 3 нг ДНК. На наш погляд, оптимальною є концентрація 10 нг/мкл.

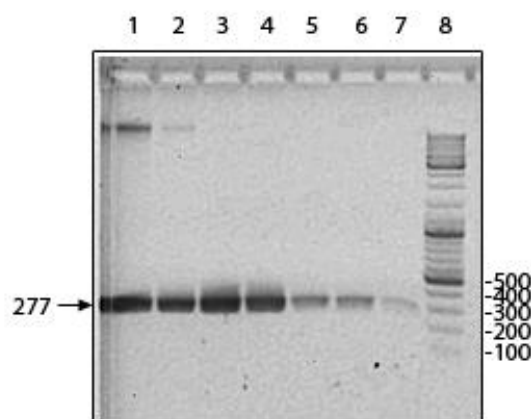


Рис. 6.4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи для визначення мінімальної достатньої кількості ДНК з праймерами *ZEIN4* та *ZEIN3*: доріжки 1–7 – зразок № 30 з концентрацією ДНК, відповідно, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 нг/мкл; 8 – маркер молекулярної маси 1 kb Plus DNA Ladder.

На рис. 6.5 наведено нуклеотидну послідовність зразка 18, вивчену за допомогою бази даних NCBI з використанням програми BLAST (Altschul et al., 1997). Як видно з вирівнювання, сиквенс зразка 18 на 99 % ідентичний відомій синтетичній конструкції, яка відповідає трансформаційній події MON810.

Це дослідження було першим повідомленням про знаходження достовірного відновлюваного джерела, тобто насіння генетично модифікованої кукурудзи зарубіжного походження на теренах України. Дані дослідження підтверджують важливість здійснення належного державного регулювання і контролю обігу трансгенних рослин у вітчизняному виробництві. Отримані результати уможливають підрахунок орієнтовної частоти трансгенної кукурудзи лінії MON810 в Україні станом на весну 2009 року. За нашими оцінками вона становить приблизно 4 % ($2/50 = 0,04$).

```

>gb|AY326434.1| Synthetic construct truncated CRYIA(b) (cryIA(b)) gene, partial
cds
Length=4180

Score = 664 bits (359), Expect = 0.0
Identities = 362/363 (99%), Gaps = 1/363 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 10 ATCCTTCGC-AGACCCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTTCATTTGGAGAGGACACGCT 68
      |||
Sbjct 246 ATCCTTCGCAAGACCCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTTCATTTGGAGAGGACACGCT 305

Query 69 GACAAGCTGACTCTAGCAGATCTACCGTCTTCGGTACGCGCTCACTCCGCCCTCTGCCTT 128
      |||
Sbjct 306 GACAAGCTGACTCTAGCAGATCTACCGTCTTCGGTACGCGCTCACTCCGCCCTCTGCCTT 365

Query 129 TGTACTGCCACGTTTCTCTGAATGCTCTCTTGTGTGGTGATTGCTGAGAGTGGTTTAGC 188
      |||
Sbjct 366 TGTACTGCCACGTTTCTCTGAATGCTCTCTTGTGTGGTGATTGCTGAGAGTGGTTTAGC 425

Query 189 TGGATCTAGAATTACACTCTGAAATCGTGTCTGCCTGTGCTGATTACTTGCCGTCCTTT 248
      |||
Sbjct 426 TGGATCTAGAATTACACTCTGAAATCGTGTCTGCCTGTGCTGATTACTTGCCGTCCTTT 485

Query 249 GTAGCAGCAAAATATAGGGACATGGTAGTACGAAACGAAGATAGAACCTACACAGCAATA 308
      |||
Sbjct 486 GTAGCAGCAAAATATAGGGACATGGTAGTACGAAACGAAGATAGAACCTACACAGCAATA 545

Query 309 CGAGAAATGTGTAATTTGGTGCTTAGCGGTATTTATTTAAGCACATGTTGGTGTATAGG 368
      |||
Sbjct 546 CGAGAAATGTGTAATTTGGTGCTTAGCGGTATTTATTTAAGCACATGTTGGTGTATAGG 605

Query 369 GCA 371
      |||
Sbjct 606 GCA 608

```

Рис. 6.5. Вирівнювання нуклеотидної послідовності зразка № 18.

6.1.2. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій GA21 та NK603

Для дослідження були обрані зразки різноманітного походження (з торгівельної мережі, із селекційних колекцій тощо), суміш, приблизно, 150 зразків. Цей дослід мав за мету виявити загальну картину присутності кукурудзи з ознакою стійкості до гліфосату. Всі зразки були висіяні на ділянці у селекційній станції м. Сміла. Зійшло близько 35 000 рослин (рис. 6.5, ліворуч). Рослини, що зійшли, були обприскані гербіцидом Ураган® Форте, який містить основною діючою речовиною гліфосат. За два тижні рослин, які вижили, нараховувалося понад 400 (рис. 6.5, праворуч).

Причин, що забезпечили стійкість рослин до гербіциду, може бути декілька. По-перше, стійкість могла виникнути природним шляхом в результаті мутації; по-друге, імовірно, що стійкі зразки є носіями трансгенних ознак (трансформаційна подія NK603 або GA21). Або це випадковість, наприклад, на рослини потрапило недостатньо гербіциду.



Рис. 6.5. Досліджувані рослини кукурудзи до обробки гербіцидом (ліворуч) та за два тижні після обробки (праворуч).

Було проведено самозапилення кожної рослини. Після дозрівання всі качани були зібрані та розподілені за фенотипом на 7 груп (табл. 6.1).

Водночас, аналогічний дослід, але зі зразками, зібраними в м. Києві та області, був поставлений на ділянці Інституту фізіології рослин та генетики НАН України. Насіння було висіяне у відкритий ґрунт та через 2 тижні після отримання сходів обприскані гербіцидом Ураган[®] Форте. Стійкими до гербіциду виявилися всі рослини зразків № 54, 84 та лише одна рослина, що належала до зразка № 80.

Таблиця 6.1

Розподіл стійких рослин за фенотиповим проявом

Група	Стійкість	Місце проведення дослідів	Фенотипові особливості
1	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Цукрова, довге зерно
2	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Кругле, широке, цукрове зерно
3	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Цукрове, найбільш зморщене, квадратне зерно
4	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Гібридний фенотип
5	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Гібридний фенотип
6	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Гібридний фенотип
7	До гліфосату	Ділянка НДС, м. Сміла	Тускле зерно

Зразки насіння обох дослідів надалі досліджувалися методами ГМ-специфічного скринінгу. Нами була висунута гіпотеза, що в результаті експерименту виявлено генетично модифіковані рослини. Для перевірки було

обрано два шляхи: по-перше, провести ампліфікації методом ПЛР з двома гніздовими праймерами для виявлення гена *epsps*; по-друге, висіяти насіння, що одержали із виживших рослин, в теплиці та обробити паростки гербіцидом Ураган® Форте для підтвердження стійкості.

З отриманого насіння виділяли ДНК. Насіння замочували на дві доби у чашках Петрі на зволоженому дистильованою водою (з додаванням фунгіциду Максим Стар®) фільтрувальному папері за кімнатної температури. З трьох насінин зрізали паростки і об'єднували в один зразок. Маса зразка становила близько 200 мг. Загальну ДНК виділяли методом ЦТАБ. Осад сумарної ДНК розчиняли в ТЕ буфері рН 8,0. Якість виділеної ДНК аналізували методами електрофорезу ДНК в агарозному гелі, спектрометрично та методом ПЛР з використанням праймерів на ген зеїну. Спектрофотометричне дослідження чистоти й якості одержаних препаратів проводили на спектрофотометрі Biophotometr Eppendorf V 1.35. Концентрація ДНК після виділення для більшості зразків становила приблизно 400 мкг/мл. Доводили концентрацію ДНК для усіх зразків до 100 нг/мкл (нормалізований маточний розчин). Для проведення ПЛР-аналізу ДНК розводили до концентрації 10 нг/мкл як було встановлено вище.

Для підтвердження здатності виділеної ДНК до ампліфікації проводили ПЛР-аналіз із праймерами *ZEIN3* та *ZEIN4*, специфічними до гена *ze1* кукурудзи (кодує білок зеїн, розмір 10 тис. п.н.) (Studer et al., 1997). Якщо виділена ДНК кукурудзи присутня в пробі, інтактна і здатна до ампліфікації, то слід очікувати появу смуги, що відповідає фрагменту ДНК довжиною 277 п.н. Результати такого експерименту представлено на рис. 6.6.

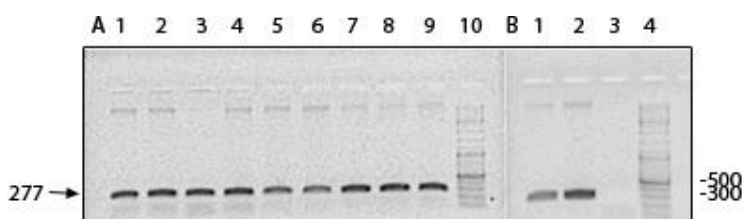


Рис. 6.6. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі на ген *ZEIN*: А) доріжки 1–9 – зразки 130–138, 10 – маркер Ladder Mix; Б) 1 – зразок 139, 2 – позитивний контроль, 3 – негативний контроль, 4 – маркер Ladder Mix.

Інтенсивність забарвлення амплікону порівняно однакова для різних зразків, що вказує на рівні умови для усіх зразків і, відповідно, об'єктивність аналізу.

Після виділення та очистки загальної ДНК аналізували її на наявність трансформаційної події GA21. Реакційні суміші були ідентичні за виключенням специфічних праймерів. Використовували дві пари гніздових праймерів – GA21 FR та GA213 3-5. Спершу ампліфікацію проводили парою праймерів GA21F та GA21R. Ці праймери є специфічними до трансформаційної події. Форвардний праймер GA21F специфічно зв'язується з рослинною ДНК, реверсний праймер GA21R сідає на актиновий промотор. Довжина амплікону становить 112 п.н. Результати експерименту представлено на рис. 6.7. Було виявлено шість позитивних зразків – 130, 131, 135, 136, 137, 139.

Для підтвердження наявності трансформаційної події GA21 провели ампліфікацію з праймерами GA21 3-5' та GA21 3-3'. Дана пара праймерів є специфічною до конструкції. Форвардний праймер GA21 3-5' сідає на послідовність оптимізованого хлоропластного транзитного пептиду (ОТР), а реверсний праймер GA21 3-3' специфічно зв'язується з послідовністю (*m*)-EPSPS гена.

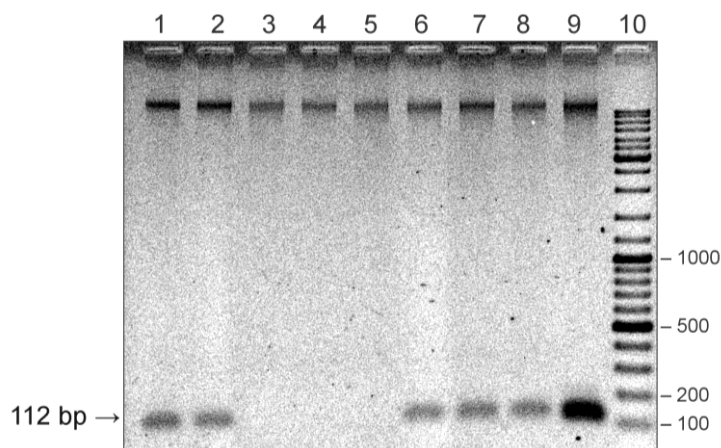


Рис. 6.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи для детекції трансформаційної події GA21 праймерами GA21F та GA21R: доріжки 1–8 – зразки № 130–137; 9 – позитивний контроль, 10 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Довжина амплікону становить 133 п.н. Виявили п'ять позитивних зразків – 131, 135, 136, 137, 139, чим підтвердили попередній дослід. Те, що зразок 130 не прореагував, пов'язано, вірогідніше за все, з різною специфічністю праймерів. Результати аналізу представлено на рис. 6.8.

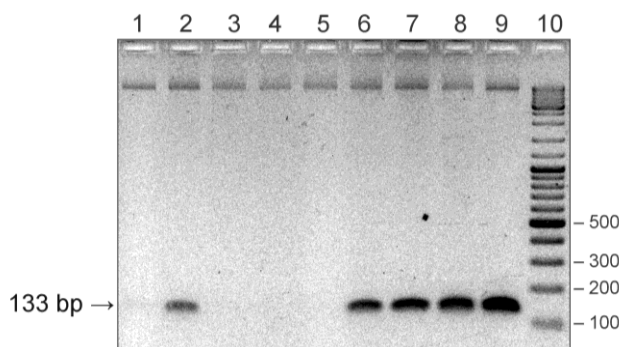


Рис. 6.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,6 % агарозі для детекції трансформаційної події GA21 праймерами GA21 3-5' та GA21 3-3': доріжки 1–8 – зразки № 130–137; 9 – позитивний контроль; 10 – маркер молекул. маси DNA Ladder Mix.

Також нами було проведено аналіз цих самих зразків на присутність трансформаційної події NK603. Для аналізу були обрані дві пари гніздових праймерів під назвою *NK603 FR* та *No13-14*. Результати, одержані в обох дослідках, були негативними. Тому було зроблене припущення, що стійкість рослин до гліфосату забезпечується саме трансформаційною подією GA21.



Рис. 6.9. Молоді рослини кукурудзи після обробки гербіцидом гліфосатом в умовах закритого ґрунту: № 58 – негативний контроль, нетрансгенна лінія кукурудзи (ліворуч), що загинула; дослідний зразок № 134 – лінія, яка загинула (посередині); зразок № 135 – стійка лінія, що прекрасно вижила (праворуч), ПЛР позитивна на трансформаційну подію GA21.

Для підтвердження присутності трансформаційної події GA21 проводили дослід в теплиці. Метою даного дослідження була перевірка, внаслідок чого стійкість до гліфосату проявили рослини зразків № 132, 133, 134. Це може бути спричинено природними мутаціями або викликано недосконалістю поставленого дослідження (гербіцид просто не потрапив на рослину через неякісне обприскування або через те, що рослину захистив бур'ян).

По двадцять насінин кожного зразка № 130–139 було замочено на три доби у слабкому розчині фунгіциду Максим Стар®. Після проростання насіння було висаджено в горщики. Через 2 тижні рослини мали по 3–4 листки і були висотою 10–15 см. Ми провели підрахунок кількості рослин, що зійшли, та обробили їх гербіцидом Ураган® Форте 500 г/л гліфосату. Внаслідок дії гербіциду деякі рослини загинули (рис. 6.9). Результати дослідження наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.2

Результати обробки гербіцидом рослин у теплиці

Польовий номер	Висіяно зерен, шт	Зійшло рослин, шт	Залишилось рослин після обробки гербіцидом, шт	ПЛР на трансформаційну подію GA21
130	20	20	20 (100 %)	+/-
131	20	19	17 (90 %)	+
132	20	15	0	-
133	20	18	0	-
134	20	16	0	-
135	20	20	14 (70 %)	+
136	20	20	13 (65 %)	+
137	20	20	12 (60 %)	+
138	20	20	0	-
139	20	20	11 (55 %)	+/-
Контроль (№ 58)	20	18	0	-

Одержані результати чітко співпадають з результатами, одержаними після ампліфікації. Отже, можна з упевненістю сказати, що в зразках під номерами 130, 131, 135, 136, 137, 139 наявна трансформаційна подія GA21.

Тому можна зробити висновок, що середня частота зустрічальності трансформаційної події GA21 в Україні становить приблизно 4 % (6 позитивних сигналів на 150 досліджуваних зразків) (Власова та ін., 2011).

6.1.3. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність занесених трансгенних форм

Для дослідження використовували зразки кукурудзи, зібрані в м. Дніпрі та області. У кукурудзи однією з найбільш поширених трансгенних ознак є стійкість до стеблового метелика *Ostrinia nubilalis*, яка відбувається завдяки експресії гена *cry1Ab* бактерії *Bacillus thuringiensis* (носії даного гена – лінії Bt176, MON810) та толерантність до гербіцидів на основі гліфосату (таких як, наприклад, Раундап, Ураган Форте[®]), яка детермінується експресією гена *epsps* (наприклад, лінії GA21, NK603). Тому нами були проведені дослідження на наявність декількох трансформаційних подій, а саме GA21, NK603, MON810, Bt176.

У даній роботі досліджували 40 зразків насіння кукурудзи. Для аналізу використовували метод ПЛР. Спочатку було проаналізовано зразки на присутність трансформаційної події Bt176. Проводили ампліфікацію з праймерами *CRYI* A3-A4. В результаті дослідження спостерігали один позитивний сигнал. На рис. 6.10 наведено результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК з праймерами *CRYI* A3-A4.

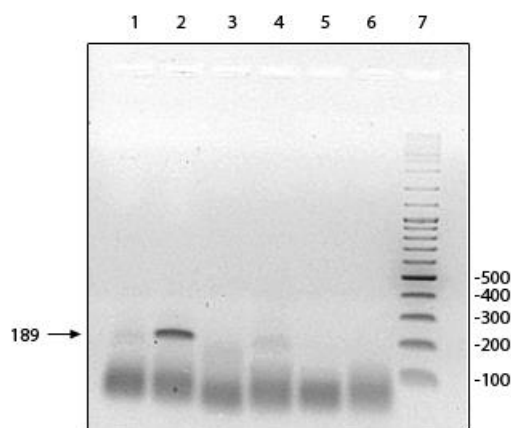


Рис. 6.10. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,6 % агарозі для детекції трансформаційної події Bt176: доріжки 1–5 – зразки № 164–168; 6 – негативний контроль, 7 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для виявлення трансформаційної події *NK603* було проведено 2 аналізи з праймерами *No13-14* (довжина ампліфікованого фрагмента 783 п.н.) та *NK603 FR* (довжина ампліфікованого фрагмента 108 п.н.). В результаті першої ампліфікації одержали потенційно позитивні зразки (рис. 6.11), але сигнали не були достовірно підтверджені під час проведення ПЛР з іншими праймерами (рис. 6.12). Під час другої ампліфікації використовували праймери *NK603 FR*, що є специфічними до події, а, отже, результати реакції з ними є більш достовірними. Форвардний праймер *NK603 F* сідає на вбудовану Т-ДНК, а реверсний *NK603 R* на фланкуючу рослинну ДНК.

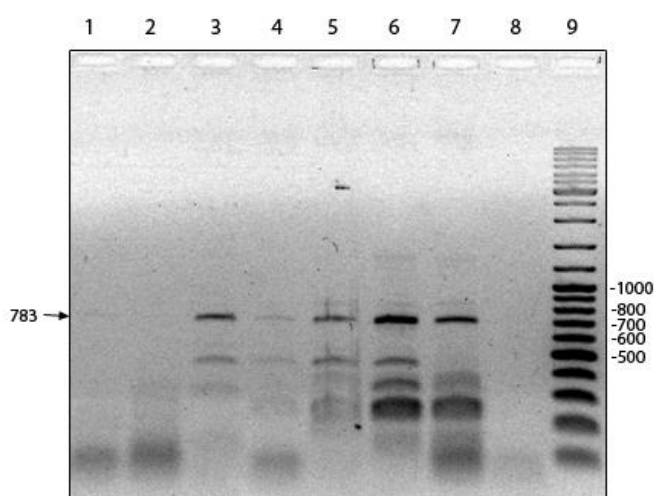


Рис. 6.11. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі з праймерами *No13-14* для детекції трансформаційної події *NK603*: доріжки 1–7 – зразки 149, 153, 157, 163–167; 8 – негативний контроль; 9 – маркер мол. маси DNA Ladder Mix.

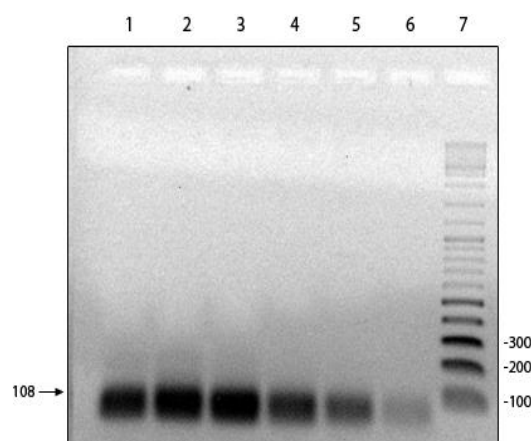


Рис. 6.12. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,6 % агарозі з праймерами *NK603 FR* для детекції трансформаційної події *NK603*: доріжки 1–5 – зразки 157, 163–167; 6 – негативний контроль; 7 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Також зразки було перевірено на наявність інших трансформаційних подій, а саме *GA21* і *MON810*. На рис. 6.13 та 6.14 представлено результати електрофорезу продуктів ампліфікації ДНК.

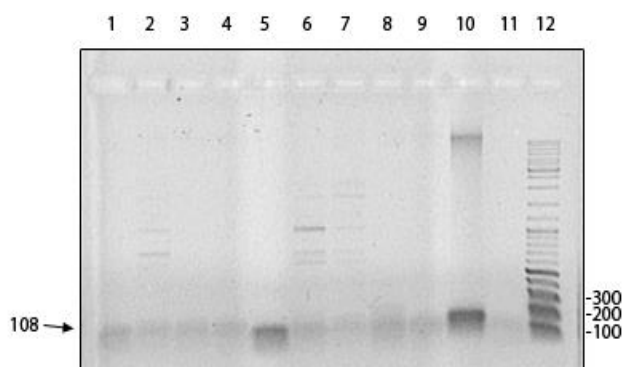


Рис. 6.13. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі з праймерами *GA21 FR* для детекції трансформаційної події *GA21*: доріжки 1–9 – зразки 159–167; 10 – позитивний контроль; 11 – негативний контроль; 12 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

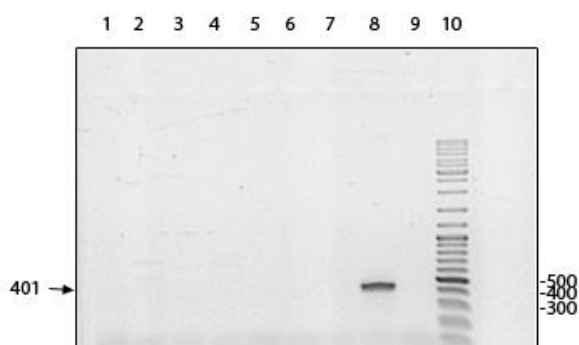


Рис. 6.14. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі з праймерами *mg1*, *mg2* для детекції трансформаційної події *MON810*: доріжки 1–7 – зразки 169–175; 8 – позитивний контроль; 9 – негативний контроль; 10 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

В результаті аналізу 40 зразків кукурудзи, зібраних в Дніпропетровській області, був виявлений один позитивний зразок, що містив трансформаційну подію Bt176, і п'ять зразків, що, імовірно, містили трансформаційну подію NK603. Отже, можна зробити висновок, що в Дніпропетровській області є генетично модифікована кукурудза, а саме трансформаційні події NK603 та Bt176. Частота зустрічальності становить 5–10 % (Власова та ін., 2011).

6.1.4. Розробка мультиплексної реакції для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією гена зеїну кукурудзи

Ампліфікація гена зеїну кукурудзи є перевіркою якості препарату ДНК та здатності його до ампліфікації після виділення з клітини, що проводиться обов'язково. Для зручності аналізу було вирішено розробити дуплексну реакцію одночасної перевірки зразків на зеїн та поширену трансформаційну подію GA21. Було обрано зразки під номерами 113, 291, 297 та 407, які під час перевірки на присутність трансформаційної події GA21 дали позитивний сигнал. Як праймери вибрано пари: *ZEIN3* та *ZEIN4* (довжина амплікону становить 277 п.н.) та *GA21 FR* (довжина ампліфікованого фрагменту – 108 п.н.). Важливо було підібрати такі праймери, щоб розмір ампліконів достовірно відрізнявся на електрофореграмі.

Спочатку проводили оптимізацію за критерієм температури. Зразки ампліфікували методом градієнтної ПЛР. Температуру змінювали від 50 °C з градієнтом $G = 3$ °C. Вирішено було проаналізувати такі температури: 47,4; 50,2 і 52,5 °C. На рис. 6.15 представлено результати проведеного аналізу.

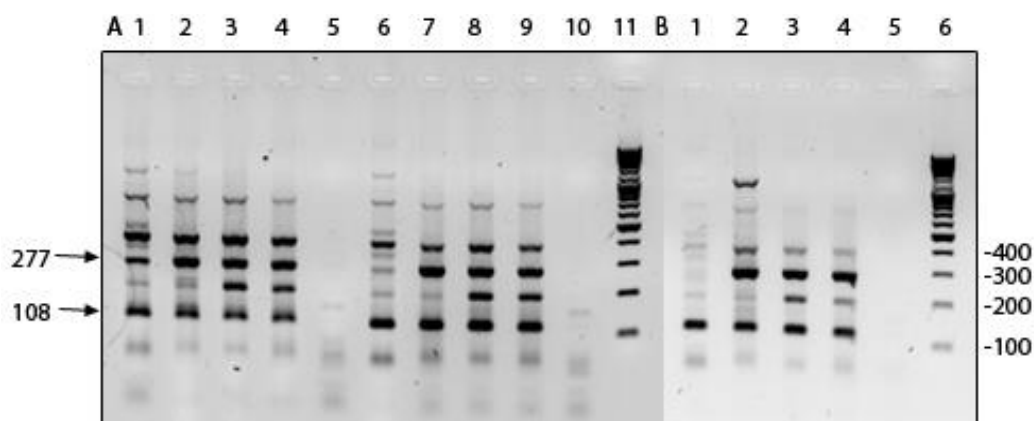


Рис. 6.15. Електрофореграма продуктів мультиплексної ПЛР з праймерами *ZEIN34* та *GA21 FR* для детекції трансформаційної події *GA21* та гена *ze1* за різної температури гібридизації: **А)** доріжки 1–4 – 47,4 °С; 6–9 – 50,2 °С; **В)** доріжки 1–4 – 52,5 °С. **А)** доріжки 1–4, 6–9 – зразки 113, 291, 297, 407 відповідно за різних температур; 5, 10 – негативний контроль; 11 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; **В)** доріжки 1–4 – зразки 113, 291, 297, 407; 5 – негативний контроль; 6 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

З даного експерименту зробили висновок, що оптимальною температурою є 52,5 °С (рис. 6.15 доріжки В 1–4), але спостерігали велику кількість неспецифічних продуктів реакції.

Для уникнення цього було застосовано режим «Touchdown» (Huang, Cloutier, 2007). Одночасно визначали оптимальну концентрацію праймерів – готували дві реакційні суміші, в одній з яких замість стандартної кількості праймерів по 0,5 мкл, праймери *GA21 FR* додавали у кількості 0,75 мкл. На рис. 6.16 представлено результати цього аналізу.

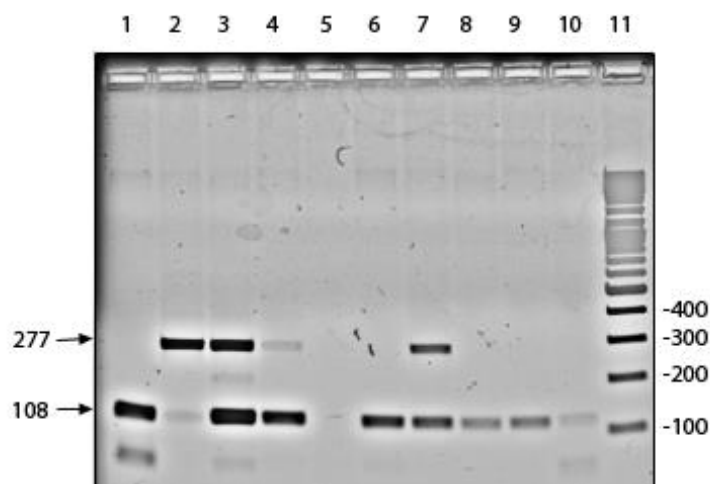


Рис. 6.16. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі з праймерами *ZEIN34* та *GA21 FR* для детекції трансформаційної події *GA21* та гена *ze1*: доріжки 1–4, 6–9 – зразки 113, 291, 297, 407 за різних концентрацій праймерів *GA21 FR*; 5, 10 – негативний контроль; 11 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Було зроблено висновок, що зміна концентрації не дала бажаного ефекту, а також потрібно оптимізувати температуру. Тому знизили температуру до 51 °С та одержали такий результат гел-електрофорезу продуктів ампліфікації (рис. 6.17).

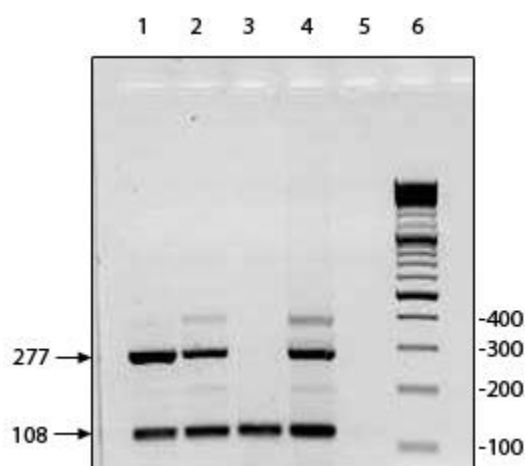


Рис. 6.17. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі з праймерами *ZEIN34* та *GA21 FR* для детекції трансформаційної події *GA21* та гена *ze1*: доріжки 1–4 – зразки 113, 291, 297, 407; 5 – негативний контроль; 6 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Отже, в результаті експерименту було розроблено умови для проведення мультиплексної реакції ПЛР для детекції трансформаційної події *GA21* та гена *ze1*. Як праймери було обрано пари *ZEIN34* та *GA21 FR*, оскільки розміри їх ампліконів відрізняються настільки, що можуть бути чітко розділені методом електрофорезу. Оптимальна температура відпалу праймерів має становити 51 °С. Для уникнення ампліфікації неспецифічних продуктів необхідно застосовувати режим «Touchdown». Кількість праймерів в реакційній суміші має становити по 0,5 мкл кожного.

6.1.5. Розробка мультиплексної реакції для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603

У даній роботі розробляли умови для одночасної детекції таких поширених трансформаційних подій як MON810 та NK603. Спочатку умови підбирали для ПЛР-аналізу з праймерами *No13-14* та *mg1-2*. Оптимізацію проводили за критерієм температури за допомоги градієнтної ПЛР. Середня температура становила 52 °С, а градієнт $G = 3$ °С. В результаті зразки ампліфікувалися за температур 50,0; 50,6; 52,2 та 53,1 °С (рис. 6.17).

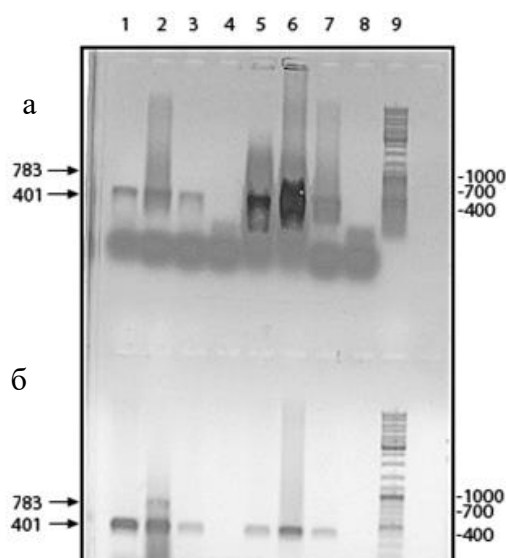


Рис. 6.17. Електрофореграма продуктів мультиплексної ПЛР з праймерами *No13-14* та *mg1-2* для детекції трансформаційних події MON810 та NK603 за різної температури гібридизації: **а)** доріжки 1–4 – 50,0 °С; 5–8 – 50,6 °С; **б)** доріжки 1–4 – 52,2 °С; 5–8 – 53,1 °С; **а)** доріжки 1–3, 5–7 – зразки 30, 402, 403 за різних температур; 4, 8 – негативний контроль; 9 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; **б)** доріжки 1–3, 5–7 – зразки 30, 402, 403 за різних температур; 4, 8 – негативний контроль; 9 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

В результаті ампліфікації очікували два фрагменти – довжиною 783 п.н. та 401 п.н., проте сигнал 783 п.н. взагалі був відсутній, що може бути пов'язано з поганою якістю праймерів. Тому ми вирішили використати іншу пару праймерів, а саме *NK603F-R*. На рис. 6.18 представлено одержані результати.

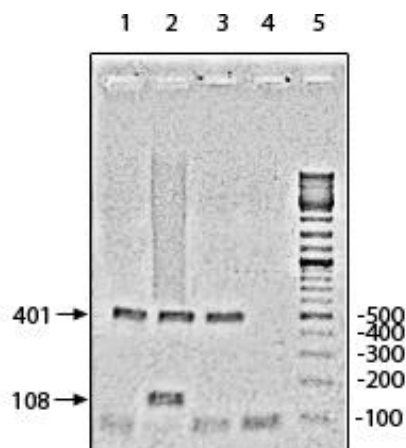


Рис. 6.18. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК кукурудзи в 1,2 % агарозі з праймерами *mg1-2* та *NK603F-R* для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603: доріжки 1–3 – зразки 30, 402, 401; 4 – негативний контроль; 5 – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Спостерігали неочікувану картину. Сигнал довжиною 108 п.н., як і належить, проявлявся у зразка № 402, але сигнал довжиною 401 п.н. був присутній у всіх трьох зразках. Імовіріше за все, це пов'язано з тим, що пара праймерів *mg1-2*, яку застосовували в даному аналізі, є специфічною до конструкції. Тож, в зразках 401 і 402 використана саме ця конструкція.

Таким чином, у результаті проведеної роботи було визначено мінімальну необхідну концентрацію ДНК для одержання достовірних результатів ПЛР, що становить 10 нг/мкл. Розроблено умови для постановки мультиплексної реакції визначення трансформаційних подій GA21 з одночасною ампліфікацією гена *ze1* як контролю – підібрано праймери таким чином, щоб амплікони чітко розділялися методом електрофорезу – ZEIN34 (277 п.н.), GA21 FR (112 п.н.); оптимальна концентрація праймерів становить для ZEIN3; ZEIN4; GA21F та GA21R – 0,5 мкМ; температура гібридизації, що забезпечує максимальний рівномірний вихід продуктів ампліфікації, становить 51 °С; застосовано режим “touchdown” з максимальною температурою 65 °С і поступовим зниженням за 15 циклів.

Розроблено умови для постановки мультиплексної ПЛР визначення трансформаційних подій MON810 та NK603: як праймери обрано пари *mg1-2* (амплікон 401 п.н.) та *NK603F-R* (амплікон 108 п.н.); оптимальна температура відпалу праймерів становить 52 °С; кількість праймерів у

реакційній суміші має становити по 0,5 мкл кожного. Проведено моніторинг присутності ГМ-кукурудзи на ринку України, що, за нашими оцінками, становить від 5 до 10 %.

Застосування удосконаленої методики мультиплексної ПЛР для проведення аналізу дослідницькими лабораторіями дає змогу: знизити витрати на реактиви для ПЛР та електрофорезу; заощаджувати трудовитрати на постановку реакції; зменшити завантаження устаткування і збільшити швидкість проведення експерименту.

6.2. Ідентифікація трансгенного статусу гербіцид-стійкого ріпаку на території Київської області

Метою даного дослідження було виявлення забрудненості сортового матеріалу ріпаку, зібраного на території Київської області, трансгенними формами, використовуючи фізіологічні дослідження та молекулярний аналіз. Для проведення моніторингу забрудненості сортового матеріалу було використано 270 зразків насіння ріпаку *Brassica napus* L., наданих селекціонерами та зібраними у торгівельній мережі міста Києва та області.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції та її модифікацій (Rubie et al., 1999; Pirae, Vining, 2002). Фізіологічні дослідження у холодний період року проводили у теплиці, а в теплий – на дослідній ділянці шляхом пророщення попередньо оброблених фунгіцидом зерен кожного зразка. Рослини підрощували до появи двох-трьох справжніх листків і обприскували робочими розчинами неселективних гербіцидів: «Ураган форте 500 SL в.р.к.» (Syngenta), діючою речовиною якого є гліфосат, або «Basta» (Bayer CropScience), діючою речовиною якого є глюфосинат амонію, відповідно до рекомендацій виробника. Після 14-добового (для рослин оброблених гербіцидом «Ураган форте 500 SL в.р.к.») чи 5-добового (для рослин оброблених гербіцидом «Basta») культивування відмічали виживаність рослин (рис. 6.19).

Серед досліджуваної вибірки спостерігався один зразок (№ 241), усі рослини якого були стійкими до дії гліфосату (рис. 6.19). Крім того було виявлено ще один зразок (№ 270), 7 рослин якого зі 100 вирощених, виявилися стійкими до глюфосинату амонію (рис. 6.20). Рослини негативного контролю, тобто які не оброблялися гербіцидом, показували здоровий, характерний ріст і формували зелений насичений колір.

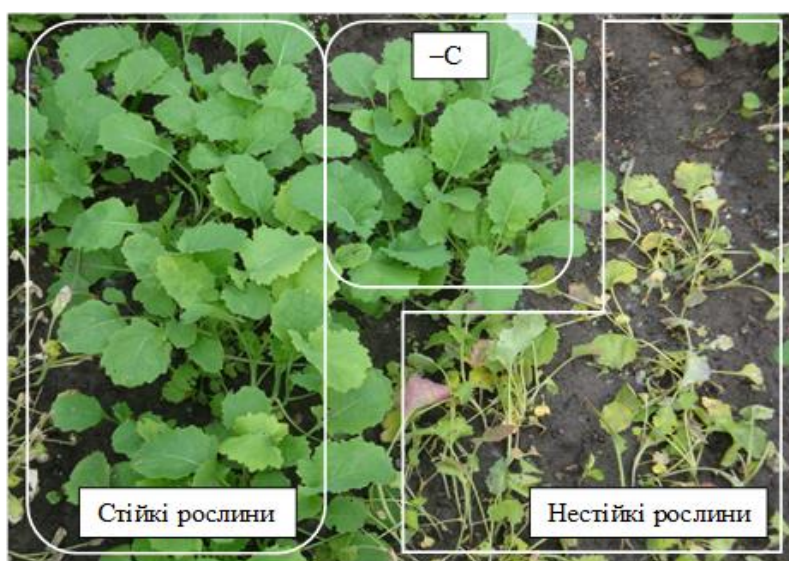


Рис. 6.19. Стійкі та нестійкі до гліфосату рослини ріпаку після обробки гербіцидом «Ураган Форте 500 SL в.р.к.» порівняно з негативним контролем без обробки.

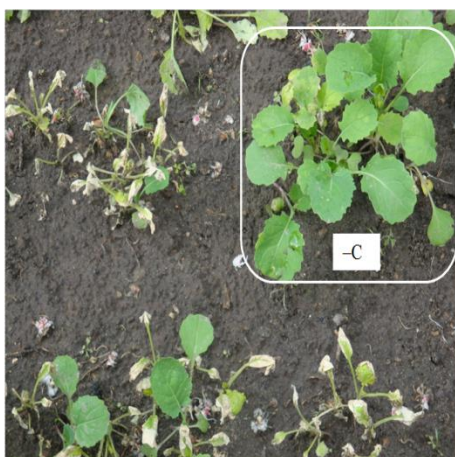


Рис. 6.20. Ріпак після обробки гербіцидом «Basta» та контрольна група рослин (без обробки гербіцидом).

Зі зразків № 241 та № 270, було вибрано по 4 рослини, що вижили після обробки гербіцидами глюфосинатом амонію та гліфосатом відповідно, з яких і було виділено загальну рослинну ДНК. Ці препарати нуклеїнових

кислот з 8 окремих рослин використовували для проведення молекулярно-генетичного аналізу на наявність трансгенів. На рис. 6.21 представлено результати визначення наявності у геномі рослин трансформаційної події GT73, яка характеризується стійкістю до гліфосату.

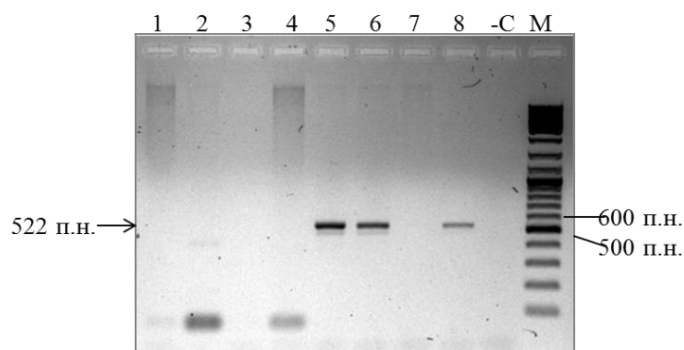


Рис. 6.21. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ріпаку з праймерами для встановлення присутності трансформаційної події GT73. Доріжки 1–4 – чотири рослини зразка № 241, які вижили після обробки глюфосинатом амонію; 5–8 – чотири окремі рослини зразка № 270, які вижили після обробки гліфосатом; -C – ТЕ буфер у якості негативного контролю; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Наявність характерного амплікону розміром 522 п.н. спостерігалась у трьох з чотирьох проаналізованих рослин зразка № 270 (доріжки 5, 6 та 8, рис. 6.21). Отже, можна стверджувати про присутність трансформаційної події GT73 компанії Монсанто у зразка № 270 насіння ріпаку. Для підтвердження присутності трансгенного матеріалу було проведено ПЛР з ген-специфічними праймерами 4F та 4R (рис. 6.22) на *cp4 epsps*, який власне і надає стійкість до гліфосату.

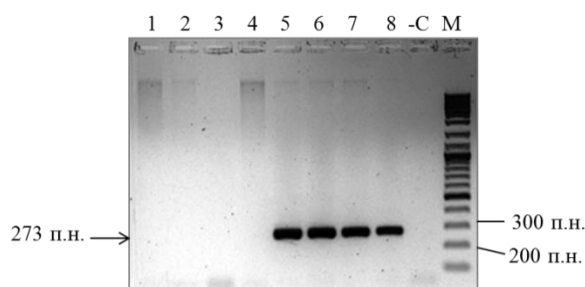


Рис. 6.22. Електрофореграма продуктів ампліфікації на трансген *cp4 epsps*, який входить до Т-ДНК трансформаційних подій GT73 і GT200. Доріжки 1–4 – чотири рослини зразка № 241, які вижили після обробки глюфосинатом амонію; 5–8 – чотири окремі рослини зразка № 270, які вижили після обробки гліфосатом; -C – ТЕ буфер як негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Ліворуч стрілкою вказано положення та довжину очікуваного амплікону.

Очікувані амплікони розміром 273 п.н. спостерігаються для усіх чотирьох проаналізованих рослин зразка № 270, стійкого до гліфосату (доріжки 5, 6, 7 та 8 рис. 6.22). Прояв цього характерного фрагмента ДНК у трьох з чотирьох раніше аналізованих рослин (доріжки 5, 6 та 8 рис. 6.21) підтверджує наявність у цих трьох рослинах трансформаційної події GT73. Можна зазначити, що лише три чверті насіння зразка № 270 містить GT73, тоді як решта 25 % є домішками невідомої природи, але з чітко вираженою стійкістю до гліфосату. Виявлення амплікону на доріжці 7 рис. 6.22 свідчить про наявність у цієї рослини трансгена *cp4 epsps*, властивого для трансформаційних подій GT73 і GT200. Можна також припустити, що оскільки GT73 не детектується у цій рослині, то ймовірно тут присутня трансформаційна подія GT200 чи якийсь мутантний варіант.

Для визначення природи стійкості рослин ріпаку зразка № 241 до дії глюфосинату амонію було проведено ПЛР на трансген *bar* (рис. 6.23). Притаманний амплікон розміром 494 п.н. спостерігався у трьох з чотирьох аналізованих рослин зразка № 241 (доріжки 1, 3 та 4 рис. 6.23), що вказує на присутність у геномі цих рослин трансгена *bar*.

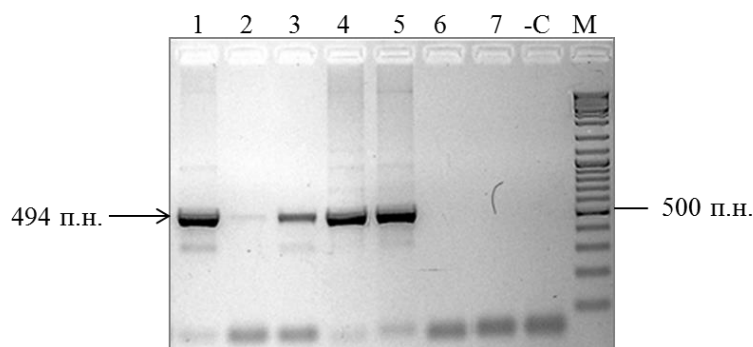


Рис. 6.23. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ріпаку з праймерами до гена *bar*. Доріжки 1–4 – чотири рослини зразка № 241, стійкі до глюфосинату амонію; 5 – позитивний контроль; 6 – одна рослина зразка № 270, стійка до гліфосату; 7 – зразок ріпаку, нестійкий до глюфосинату амонію; -C – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Ліворуч стрілкою вказано місце розміщення та довжину очікуваного амплікону.

У однієї рослини даний амплікон майже не проявляється, що підтверджує спостереження про неоднорідність насіння зразка № 270.

Перевірка зразків методом специфічної ПЛР підтвердила присутність у двох рослинах – зразка № 241, стійкого до глюфосинату амонію, та № 270, стійкого до гліфосату, трансгену *bar* і трансформаційної події GT73 з трансгеном *cp4 epsps*, відповідно. Результати дослідів також виявили значну неоднорідність насіння зразка № 241, в якому зі 100 вирощуваних лише 7 рослин виявилися стійкими до глюфосинату амонію. На противагу, усі дослідні рослини зразка № 270, будучи однорідно стійкими до згубної дії гліфосату, проявили різнорідність за наявністю трансформаційної події GT73.

Хоча виявлення трансгенних рослин ріпаку, занесених із-за кордону, залишається рідким явищем, проте завдяки їх здатності до самовідтворення і перехресного запилення, можливе поступове неконтрольоване поширення генетично модифікованих рослин на території України.

6.3. Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах

Нами проведено визначення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах. Слід зазначити, що в світі на сьогоднішній день зареєстровано 30 ліній трансгенної сої, серед них 24 лінії модифіковані на стійкість до гербіцидів, інші 6 модифіковані на стійкість до шкідників і на зміну якості продукту. В Європейському Союзі на даний момент зареєстровано 7 трансгенних ліній сої, які дозволено для використання в харчових продуктах і кормах для тварин. Найпоширенішою трансгенною лінією сої є GTS 40-3-2, яка була першою і створена в 1994 році.

Матеріалом досліджень були зразки харчових продуктів: ковбаса молочна «Дитяча», ковбаса молочна «Теляча», сосиски з сиром «Укрпромпостач 95», молочні сосиски «Укрпромпостач 95», молочні сосиски «Премія», сосиски першого сорту «Вінницькі», сардельки «Хутірські», сосиски молочні, сосиски «М'ясна Гільдія», сосиски «Колобок», сосиски з гірчицею, сосиски «Вкусняшка», карпатські сосиски, сосиски «Антошка»,

сосиски дитячі, сосиски молочні варені, сардельки Ратибор «Прем'єра», Ятрань, Кіровоградські сосиски зі смачною скоринкою, Ятрань сосиски «Тигрик», фарш соєвий, харчова добавка, халва, ковбаса 3, ковбаса 4, соєве молоко, дитяче харчування «Heinz», дитяче харчування «Gerber», білий шоколад, крабові палички «Водный мир», крабові палички «Рибний день», соєвий білок для спортсменів, халва арахісова, каша «7 злаків», сирок «Дружба». Ці зразки зібрані у роздрібній торгівельній мережі м. Києва.

Виділення загальної ДНК з харчових продуктів проводили ЦТАБ-методом. Очистка від білкової фракції досягалась двократною екстракцією хлороформом з ізоаміловим спиртом з подальшим відбором водної фази. Ізоаміловий спирт виконує роль піногасника. Для осадження ДНК використовували ЦТАБ-осаджуючий розчин, а також ізопропанол. Час осадження – 16 год. Для звільнення від фракції РНК до розчину ДНК вносили 5 мкл 10 мг/мл РНКазі А з подальшою інкубацією. Для промивки ДНК від іонів використовували 70 % етанол. Розчиняли ДНК в ТЕ буфері, який забезпечує оптимальні умови зберігання очищеної ДНК. Якість виділеної ДНК перевіряли електрофоретично та спектрофотометрично. Для отримання адекватних результатів використовували по 6 мкл зразка для проведення горизонтального гель-електрофорезу в 0,8 % агарозному гелі.

Зібрані зразки харчових продуктів перевіряли на вміст в них сої, для цього була підібрана специфічна пара праймерів на референтний ген сої *lectin*. Для перевірки специфічності і точності ідентифікації на ген *lectin* сої був підібраний ряд бобових культур (квасоля, горох, чечевиця, боби) які є теж носіями генів *lectin*. В якості позитивного контролю виступали зразки ДНК сої, негативний контроль представлений ячменем та ТЕ буфером. Результати перевірки специфічної роботи праймерів *lecMP1*, *lecMP2* представлені на рис. 6.24.

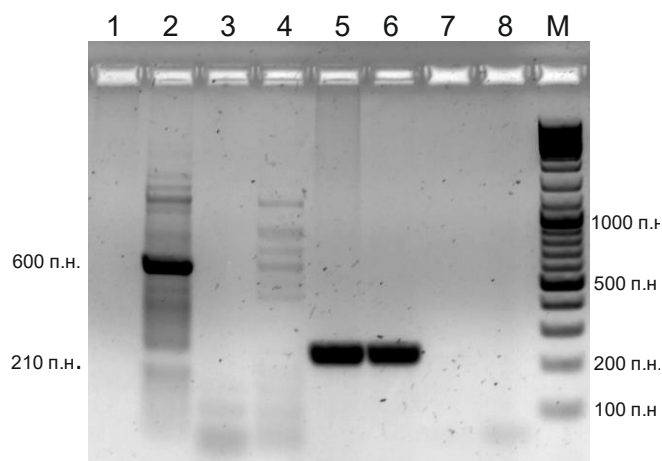


Рис. 6.24. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сої з праймерами до гена *lectin*: доріжка 1 – квасоля; 2 – сочевиця; 3 – горох; 4 – боби; 5 – соя (зелена маса); 6 – соя (зерно); 7 – ячмінь (негативний контроль); 8 – ТЕ буфер (негативний контроль); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Очікуваний амплікон 210 п.н. спостерігали на доріжках 5, 6 (рис. 6.24). Неспецифічний фрагмент з'явився на доріжці 2, але він знаходиться на довжині приблизно 600 п.н., що не є очікуваним для цієї пари праймерів. Дані результати дають нам можливість стверджувати, що підібрана пара праймерів специфічно спрацьовує саме на ген *lectin* сої. Всі зразки харчових продуктів були перевірені на вміст референтного гена сої *lectin* (рис. 6.25).

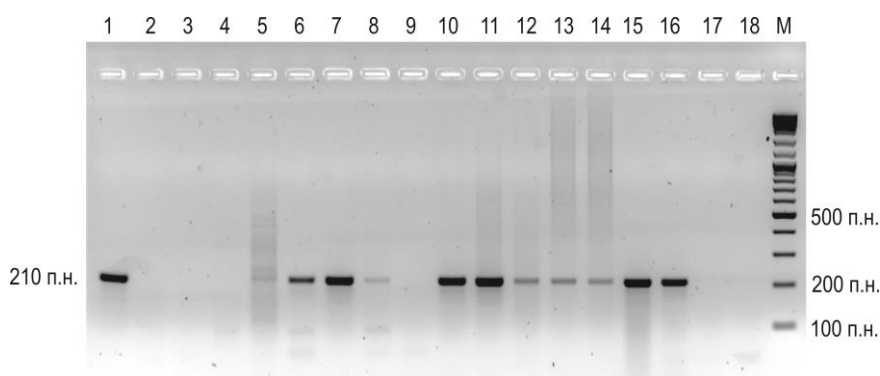


Рис. 6.25. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сої з праймерами до гена *lectin*: доріжки 1–14 – дослідні зразки; 15 – соя (зелена маса); 16 – соя (позитивний контроль); 17 – ячмінь (негативний контроль); 18 – ТЕ буфер (негативний контроль); М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Очікуваний амплікон довжиною 210 п.н. спостерігали на доріжках 1, 6–13 та 14. Перевірено 41 зразок, позитивну реакцію дали 28 зразків, серед яких 21 – харчові продукти. Це вказує на наявність гена лектину, який свідчить

про добавки соєвого зерна в харчові продукти.

6.3.1. Детекція послідовності *nos*-термінатора в зібраних зразках

Наступним етапом визначення ГМ матеріалу є проведення ПЛР на регуляторні та кодуючі послідовності конструкцій, які використовуються для трансформації рослин (наприклад термінаторні і промоторні послідовності). В даній роботі здійснювали специфічне виявлення *nos*-термінатора, який присутній у трансформаційному векторі, за допомогою якого отримують трансформаційні події сої. Результати полімеразної ланцюгової реакції представлено на електрофореграмі в 1,2 % агарозному гелі (рис. 6.26).

Очікуваний амплікон 125 п.н., спостерігали на доріжках 5–9. Перевірено 41 зразок, позитивну реакцію дали 22, серед них 19 харчових продуктів.

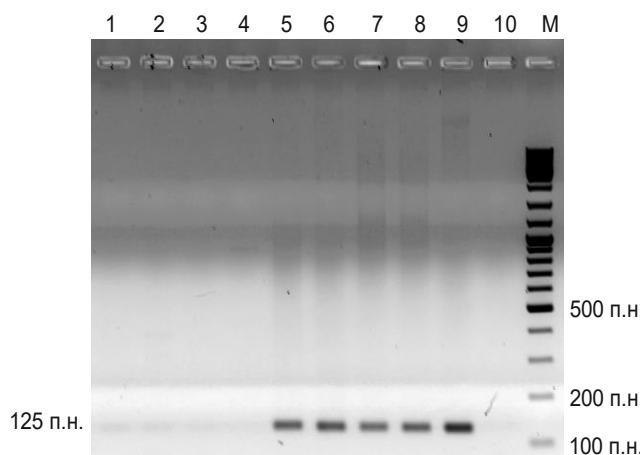


Рис. 6.26. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК на *nos*-термінатор: доріжки 1–8 – дослідні зразки; 9 – соя трансформаційної події GTS 40-3-2, позитивний контроль; 10 – ТЕ буфер, негативний контроль; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Проте для харчових продуктів не можна однозначно стверджувати про наявність у них ГМ сої, але це дає нам можливість стверджувати, що в них присутній ГМ матеріал. Для підтвердження наявності ГМ матеріалу інших рослин у складі харчових продуктів або інших трансформаційних подій сої

потрібні додаткові молекулярно-генетичні дослідження.

6.3.2. Визначення трансформаційної події GTS 40-3-2

Визначення трансформаційної події GTS 40-3-2 базувалося на специфічних праймерах до регіону, який включає в себе рослинну ДНК та ділянку Т-ДНК трансформуючого вектора. Даний підхід дозволяє визначати окремі трансформаційні події, які, як відомо, є унікальними. За оцінками експертів від 50 % до 80 % сої, що вирощується в Україні, є генетично модифікованою. Найпоширенішою трансгенною лінією сої є GTS 40-3-2, для якої була розроблена програма проведення ПЛР. В якості негативного контролю використовували ТЕ буфер та нетрансгенну лінію сої, позитивним контролем був зразок сої GTS 40-3-2 (рис. 6.27).

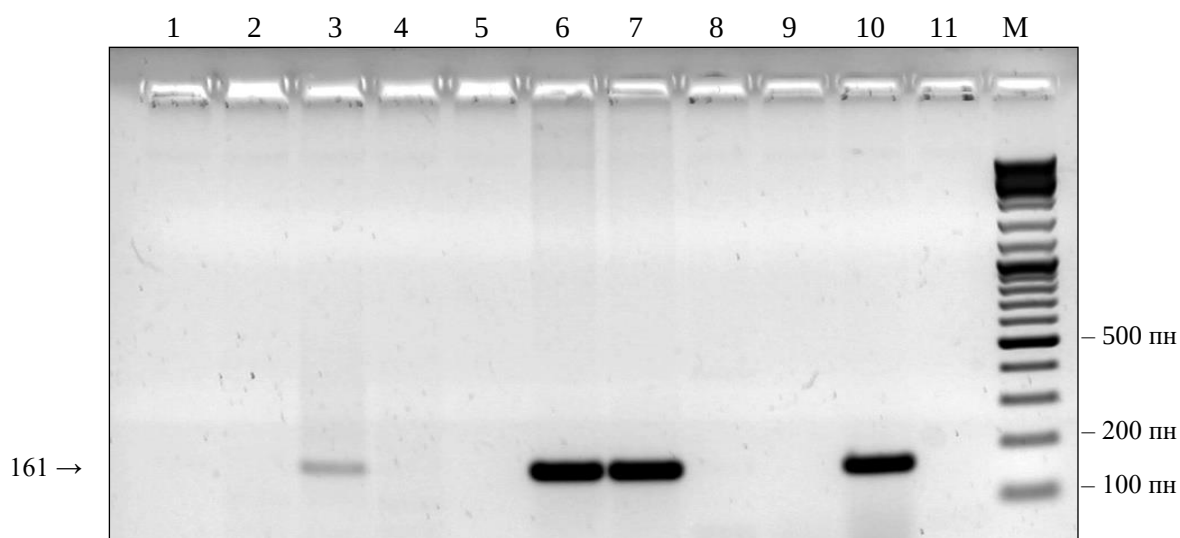


Рис. 6.27. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК на трансформаційну подію GTS 40-3-2: доріжки 1–8 – дослідні зразки; 9 – соя нетрансгенна, негативний контроль; 10 – соя, трансформаційна подія GTS 40-3-2, позитивний контроль; 10 – ТЕ буфер, негативний контроль; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Очікуваний амплікон довжиною 161 п.н. спостерігали на доріжках 2, 6–7 та 10. Це свідчить про те, що дані зразки містять трансформаційну подію GTS 40-3-2. Перевірено 41 зразок, з яких позитивну реакцію дали 6, серед

них 1 харчовий продукт іноземного виробництва, представлений соєвим білком для спортсменів; 5 зразків взято із сортозразків насіння та зеленої маси польових рослин сої з Київської, Черкаської і Кіровоградської областей.

6.3.3. Розробка мультиплексної реакції для виявлення трансформаційної події GTS 40-3-2 та референтного гена *lectin*

З практики лабораторних досліджень відомо, що мультиплексна ПЛР має ряд переваг перед стандартною, більш простою уніплексною ПЛР. Це зниження ризику контамінації зразків, можливість контролю помилково негативних результатів, зменшення витрат реактивів, скорочення часу підготовки, більш висока інформативність реакції. Нами була розроблена для аналізу зразків харчових продуктів мультиплексна ПЛР, що дозволяє одночасно провести ампліфікацію референтного гена *lectin* та трансформаційної події GTS 40-3-2.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 2 % агарозному гелі з концентрацією 0,5 мкг/мл бромистого етидію у натрій-боратному буфері з наступною ідентифікацією результатів під ультрафіолетовим випромінюванням (рис. 6.28).

Негативні контролю спрацювали адекватно: на доріжці 11 з ТЕ буфером не спостерігали наявних чітких ампліконів, на доріжці 9 спостерігали фрагмент на довжині 210 п.н., що свідчить про наявність гена *lectin* і відсутність трансформаційної події GTS 40-3-2. На доріжці 10 спостерігали два фрагменти 161 п.н. та 210 п.н. – це позитивний контроль, який вказує на наявність гена *lectin* та трансформаційну подію GTS 40-3-2.

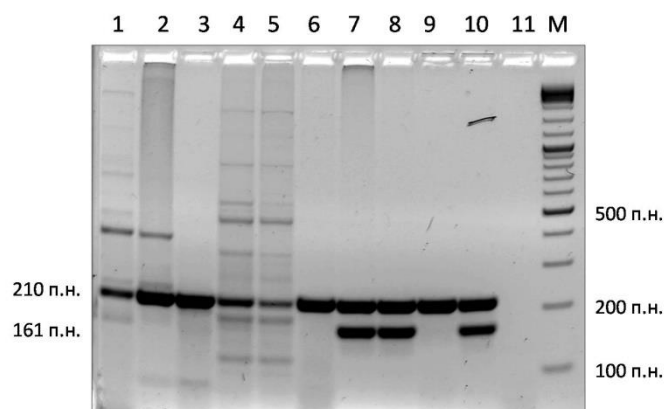


Рис. 6.28. Електрофореграма мультиплексної ПЛР на трансформаційну подію GTS 40-3-2 та референтний ген *lectin*: доріжки 1–8 – дослідні зразки; 9 – соя нетрансгенна, негативний контроль; 10 – соя трансформаційної події GTS 40-3-2, позитивний контроль; 11 – TE буфер, негативний контроль; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для зразків зернової сої практично не спостерігали мінорних продуктів реакції, але для харчових продуктів ідентифікували певні нецільові амплікони слабшої інтенсивності, що можна пояснити неспецифічною реакцією даних праймерів з іншими рослинними та тваринними ДНК, присутніми у комплексних харчових продуктах.

Отже, за допомогою мультиплексної ПЛР на ген *lectin* і трансформаційну подію GTS 40-3-2 можна проводити одночасне виявлення сої в харчових продуктах та перевірку її на трансформаційну подію. Це дасть можливість в більш короткі строки виявити наявність генетично модифікованого матеріалу в харчових продуктах. Підсумкові результати з виявлення гетерологічних послідовностей в харчових продуктах та сортозразках сої представлені в табл. 6.3.

Таблиця 6.3

Результати аналізу зразків харчових продуктів та зернового матеріалу сої на наявність гетерологічних послідовностей

№	Назва продукту, з якого виділена ДНК	Наявність гена <i>lectin</i>	Трансформаційна подія GTS 40-3-2	Наявність <i>pos</i> -термінатора
1	Ковбаса молочна «Дитяча»	+	-	-
2	Ковбаса молочна «Теляча»	+	-	+
3	Сосиски з сиром «Укрпромпостач 95»	+	-	+
4	Молочні сосиски «Укрпромпостач 95»	+	-	-
5	Молочні сосиски «Премія»	-	-	-

№	Назва продукту, з якого виділена ДНК	Наявність гена <i>lectin</i>	Трансформа- ційна подія GTS 40-3-2	Наявність <i>pos</i> - термінатора
6	Сосиски першого сорту «Вінницькі»	-	-	-
7	Сардельки «Хутірські»	+	-	-
8	Сосиски молочні	+	-	-
9	Сосиски «Мясна Гільдія»	+	-	-
10	Сосиски «Колобок»	+	-	+
11	Сосиски з гірчицею	+	-	-
12	Сосиски «Вкусняшка»	-	-	+
13	Карпатські сосиски	-	-	+
14	Сосиски «Антошка»	-	-	+
15	Сосиски дитячі	+	-	+
16	Сосиски Молочні Варені	+	-	+
17	Сарделька «Маршалок»	-	-	+
18	Соя, зерно 1, Черкаська обл.	+	+	+
19	Соя, зерно 2, Черкаська обл.	+	+	+
20	Ратибор «Прем'єра»	-	-	+
21	Кіровоградські сосиски зі смачною скоринкою	+	-	+
22	Сосиски «Тигрик»	-	-	+
23	Фарш соєвий	+	-	+
24	Харчова добавка	+	-	+
25	Ковбаса	+	-	+
26	Халва соняшникова	+	-	+
27	Квасоля	-	Н.В.	Н.В.
28	Чечевиця	-	Н.В.	Н.В.
29	Горох	-	Н.В.	Н.В.
30	Боби	-	Н.В.	Н.В.
31	Соя м. Богуслав	+	+	+
32	Соя № 2	+	-	-
33	Соя не трансгенна, контроль	+	-	-
34	Соя Кіровоградська обл.	+	+	+
35	Соєве молоко «Alpin»	+	-	-
36	Дитяче харчування Heinz	-	-	-
37	Дитяче харчування Gerber	-	-	-
38	Білий шоколад	-	-	-
39	Крабові палочки (Водний мир)	+	-	-
40	Крабові палочки (Рибний день)	+	-	-
41	Соєвий білок	+	+	+
42	Халва арахісова	+	-	-
43	Каша «7 Злаків»	-	-	-
44	Сирочок плавлений «Дружба»	+	-	-
45	Соя Білоцерківська	+	+	+

В результаті проведених досліджень з 45 опрацьованих зразків 29 містять у своєму складі ген *lectin*, специфічний для сої, серед них 23 харчові продукти (продукти марки «Премія», «М'ясна гільдія», «Ятрань»,

«Укрпромпостач 95», «Луганські делікатеси», «Маршалок», «Водний мир» і т.д.), що відповідно вказує на присутність добавок сої в них. З 29 зразків лише 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої (Київська, Черкаська та Кіровоградські області), 1 зразок харчового продукту іноземного виробництва, що представлений соєвим білком для спортсменів.

Цей факт являється прямим свідченням того, що на території цих областей вирощується трансгенна (ГМО) соя. У 22 зразках був виявлений *pos*-термінатор, серед яких 19 харчових продуктів та сортозразків сої. Проте для харчових продуктів не можна однозначно стверджувати про наявність у зразках саме ГМ сої. Для підтвердження наявності ГМ матеріалу інших рослин у складі харчових продуктів, або інших трансформаційних подій сої потрібні додаткові молекулярно-генетичні дослідження. Графічно дані можна представити у вигляді діаграми рис. 6.29.

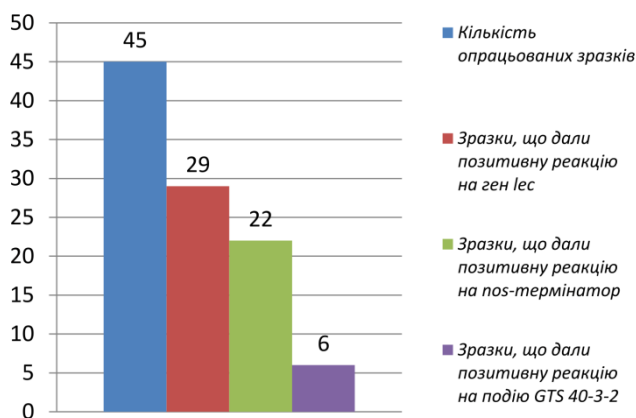


Рис. 6.29. Схематичне зображення результатів розподілу досліджуваних зразків.

Отримані дані свідчать про наявність та, очевидно, вирощування трансгенного матеріалу сої на території України. У харчових продуктах ГМ соя виявлена в одному зразку соєвого білка, але іноземного виробництва. Наявність *pos*-термінатора в харчових продуктах може свідчити про присутність трансгенного матеріалу інших культур.

Підсумовуючи, слід зазначити, що нами проведений моніторинг розповсюдження трансгенних рослин, зокрема кукурудзи, ріпаку та сої, на сільськогосподарських полях окремих областей України. Також визначено наявність продуктів переробки трансгенної сої в харчових продуктах торгівельної мережі України. Для цього нами розроблена нова вдосконалена методика детекції трансформаційних подій на основі полімеразної ланцюгової реакції.

Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій MON810, GA21 та NK603 показало, що середня частота їх зустрічальності (лінії MON810 та GA21) в Україні станом на весну 2009 року, становить приблизно 4 %. Це було першим повідомленням про знаходження відновлюваного джерела, тобто насіння генетично модифікованої кукурудзи зарубіжного походження, на теренах України. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність занесених трансгенних форм засвідчила наявність трансформаційних подій NK603 та Vt176 з частотою зустрічальності 5–10 %.

Нами розроблена мультиплексна реакція для детекції трансформаційної події GA21 з одночасною ампліфікацією гена зеїну кукурудзи та мультиплексні реакції для детекції трансформаційних подій MON810 та NK603. Застосування удосконаленої методики мультиплексної ПЛР для проведення аналізу дає змогу знизити витрати на реактиви; заощаджувати трудовитрати; зменшити завантаження устаткування і збільшити швидкість проведення експерименту.

Ідентифікація трансгенного статусу гербіцид-стійкого ріпаку на території Київської області підтвердила присутність у декількох рослинах глюфосинату амонію та гліфосату, трансгена *bar* і трансформаційної події GT73 з трансгеном *cp4 epsps*. Хоча виявлення трансгенних рослин ріпаку, занесених із-за кордону, залишається рідким явищем, проте завдяки їх здатності до самовідтворення і перехресного запилення, можливе поступове неконтрольоване поширення генетично модифікованих рослин на території

України.

Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах показало, що з 45 опрацьованих зразків – 29 містять у своєму складі ген *lectin*, специфічний для сої, серед них 23 харчові продукти, що відповідно вказує на присутність добавок сої в них. З 29 зразків 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої (Київська, Черкаська та Кіровоградські області), 1 зразок харчового продукту іноземного виробництва, що представлений соєвим білком для спортсменів. Цей факт являється прямим свідченням того, що на території цих областей вирощується трансгенна (ГМО) соя. Отримані дані свідчать про наявність та, очевидно, вирощування трансгенних рослин сої на території України. У харчових продуктах ГМ соя виявлена лише в одному зразку – соєвому білку, але іноземного виробництва. Наявність *pos*-термінатора в харчових продуктах може свідчити ймовірно про присутність трансгенного матеріалу інших культур, або забруднення продуктів ґрунтовими бактеріями.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- розроблена нова вдосконалена методика детекції трансформаційних подій на основі мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції;
- проведений моніторинг розповсюдження трансгенних рослин, зокрема кукурудзи, ріпаку та сої на території України засвідчив їх присутність з частотою від 4 до 10 %;
- отримані дані свідчать про наявність та, очевидно, вирощування трансгенного матеріалу сої на території України. Наявність *pos*-термінатора в харчових продуктах може свідчити про присутність трансгенного матеріалу інших культур;
- дані дослідження підтверджують важливість здійснення належного державного регулювання і контролю обігу трансгенних рослин у вітчизняному виробництві.

Публікації пошукача за даним розділом:

1. Taranenko A.M., Sakhno L.O., **Morgun B.V.**, Kuchuk M.V., 2015. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants. *Biotechnologia Acta*, 8(2), P. 52–57.
2. Fedorenko T., Markovskiy O., Vlasova O., Bannikova M., Kuchuk M., **Morgun B.** Detection of resistant to glyphosate maize transformation events GA21, MON88017 and NK603 among Ukrainian market samples. 2012. World Congress On *In Vitro* Biology. Abstract Issue, June 2012. – P.22.
3. **Моргун Б.В.**, М.А. Банникова, Т.В. Федоренко, А.В. Марковский, О.Н. Власова, Н.В. Кучук. Глобальное распространение и выявление трансгенной кукурузы в Украине. Тез. Межд. научн. конф. «Современные аспекты генетической инженерии растений», 30 мая – 1 июня 2011 г., С. 48.
4. **Моргун Б.В.**, Степаненко О.В., Степаненко А.І., Тараненко А.М., Кучук М.В. Виявлення на території Київської області трансгенних рослин ріпаку, стійких до гербіцидів. *Вісник Українського тов-ва генетиків і селекціонерів*, 12(2), 2014, С. 166–173.
5. Похилько С.Ю., Степаненко А.І., Орябінська Л.Б., Карпенко О.Я., Дуган О.М., **Моргун Б.В.**, 2014. Детекція трансгенної сої у вітчизняних харчових продуктах та сортозразках, які вирощуються в Україні. *Вісник Національного університету “Львівська політехніка”*. Хімія, технологія речовин та їх застосування., № 787, С. 274-280.
6. **Моргун Б.В.**, Степаненко О.В., Степаненко А.І. Спосіб детекції трансформаційної події GT73 ріпаку методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / Патент № 88203 України на корисну модель, МПК C12N 15/00; заявник та патентовласник ІКБГІ НАН України. - № u 201309296; заявл. 24.07.13, Бюл. № 5.
7. **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи NK603 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / Патент України на корисну модель № 77768. Власник ІКБГІ НАН України. Оpubліковано 25.02.2013, Бюл. № 4.
8. **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи MON810 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / Патент України на корисну модель № 77769. Власник ІКБГІ НАН України. Оpubліковано 25.02.2013, Бюл. № 4.
9. **Моргун Б.В.**, Банникова М.О., Сатарова Т.М., Борисова В.В., Кучук М.В. Спосіб визначення трансгенної лінії GA21 кукурудзи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / Патент України на корисну модель № 61602. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.07.2011. Власник ІКБГІ НАН України. Оpubліковано 25.07.2011, Бюл. № 14.

РОЗДІЛ 7

ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ У СЕЛЕКЦІЇ ЗЛАКІВ

За останні десятиліття було досягнуто суттєвих успіхів у розробці покращених сортів зернових культур шляхом традиційної селекції. Однак глобальні зміни клімату вимагають невинних зусиль у розробці та впровадженні інноваційних прийомів для створення нових форм рослин з більш високим потенціалом урожайності, стійкості до несприятливих факторів довкілля та споживчої якості. Це, спонукає до впровадження ефективних сучасних технологій, включаючи селекцію з використанням молекулярних маркерів у поєднанні з високою точністю фенотипування.

Одним з підходів до інтенсифікації процесу отримання нових сортів сільськогосподарських культур є маркер-опосередкована селекція, яка використовується в селекційних програмах економічно розвинених країн в якості новітнього методичного прийому поряд з методами традиційної селекції (Gupta et al., 2008; Collard, Mackill, 2008; Леонова, 2013; Xu et al., 2013). Маркер-допоміжна селекція має ряд переваг у порівнянні з селекцією за фенотиповими ознаками. Вона використовує теорію і методологію молекулярної біології для контролювання розмноження культурних рослин. Отримання нових сортів у такий спосіб прискорюється і може зайняти від 5–7 років залежно від виду рослин. Використання молекулярних маркерів покращує ефективність кожного етапу селекції з точки зору витрат праці та часу. Так, аналіз ДНК можна проводити в лабораторних умовах на будь-якій стадії розвитку – від насіння до дорослої рослини. При цьому можуть істотно знижуватися матеріальні витрати через скорочення числа аналізованих зразків (аналіз може бути проведений на кількох рослинах). У разі створення стійких сортів, відпадає необхідність постійного підтримання рас патогенів та тестерних ліній з генами резистентності.

Разом з тим, варто наголосити, що наявність молекулярного маркера для певного генотипу лише доповнює, а не скасовує потребу у польових випробуваннях, бо кінцева реалізація ознаки залежить від дії сукупного унікального ансамблю генів, притаманного індивіду (Леонова, 2013; Сиволап и др., 2011).

Використовуючи ДНК-маркери, було ідентифіковано значну кількість генів і локусів, які контролюють врожайність та якість зерна у різних видів злаків, стійкість до біотичних та абіотичних стресових факторів (Somers, 2005; Landjeva et al., 2007; Kalendar et al. 2011). Однак, незважаючи на величезний потенціал ДНК-маркерів, впровадження даних нових технологій у практику відбувається повільними темпами. В останні роки спостерігається тенденція більш широкого використання направлених функціональних маркерів (Kalendar, 2011). Це пов'язано з появою відкритих геномних баз даних ("Australian Wheat and Barley Molecular Marker Program" 2015; Grant et al., 2010; Colmsee et al., 2015; Fernandez-Pozo et al., 2015; Mascher et al., 2017; Blake et al., 2019; Monat et al. 2019) та відносно простих методів пошуку і розробки маркерів, які розташовані в межах або поблизу цільового гена (Perez-de-Castro et al., 2012; Nadeem et al., 2018). Найбільш цінними вважаються так звані функціональні маркери (ФМ), які розробляються на основі відомих нуклеотидних послідовностей цільового гена. ФМ дозволяють не тільки виявляти дану послідовність в геномі, але й розрізняти її алельні варіанти і передбачувати фенотиповий прояв ознаки, з якою вони пов'язані (Poczai et al., 2013; Salgotra et al., 2014; Kage et al., 2016).

Маркерні технології доцільно використовувати у «непрякій» селекції ознак, які важко фенотипуються, або вартість фенотипового аналізу яких є високою, ознак, на прояв котрих істотно впливає навколишнє середовище, й ознак з мультигенним контролем (Frisch, Melchinger, 2005; Herzog, Frisch, 2011; Хлесткина, 2011; 2013).

Метою даного розділу роботи було розробити системи ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні

зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

7.1. Розробка систем маркерів на основі ретротранспозонів для оцінки генетичного поліморфізму злакових культур

7.1.1. Дослідження генетичного різноманіття сортів *Triticum aestivum* за допомогою IRAP-маркерів

Проведено дослідження генетичного різноманіття 15 агрономічно важливих сортів пшениці: ‘Богдана’, ‘Веснянка’, ‘Гілея’, ‘Золотоколоса’, ‘Крижинка’, ‘Наталка’, ‘Переяславка’, ‘Подільська’, ‘Славна’, ‘Смуглянка’, ‘Сотниця’, ‘Спасівка’, ‘Щедрівка Київська’, ‘Фаворитка’ та ‘Ятрань 60’ за використанням маркерних систем, що базуються на міжретротранспозонному поліморфізмі.

Комбінування різних IRAP-праймерів дозволяє збільшити число досліджуваних локусів. Згідно схеми IRAP-аналізу, запропонованої Календарем, Шульманом (Kalendar, Schulman, 2006) синтез ампліконів відбувається в локусах, розташованих між інвертованими ретротранспозонами, та в локусах між одиничним LTR (“solo-LTR”) і ретротранспозоном. Тому, нами для розширення спектру ампліконів у продуктах ПЛР досліджуваних зразків було випробовувано методику поєднання IRAP-праймерів до різних ретротранспозонів в одній реакції.

На рис. 7.1 показано типову електрофореграму продуктів ампліфікації ДНК пшениці з одночасним використанням праймерів до ретротранспозонів Sabrina та Wham. При застосуванні даної маркерної системи виділено два поліморфні фрагменти довжиною 790 та 1142 п.н. Амплікон 790 п.н. спостерігали на доріжках 6, 8, 9, 10, 12, 14 та 16, що відповідає сортам ‘Веснянка’, ‘Славна’, ‘Спасівка’, ‘Сотниця’, ‘Щедрівка Київська’, ‘Золотоколоса’ та ‘Смуглянка’, відповідно. Лише два сорти – ‘Щедрівка Київська’ та ‘Малинівка’ (доріжки 12 і 13) не мали амплікона довжиною

близько 1142 п.н. У решти зразків (сорти ‘Переяславка’, ‘Подольянка’, ‘Ятрань 60’, ‘Наталка’, ‘Крижинка’, ‘Веснянка’, ‘Богдана’, ‘Славна’, ‘Спасівка’, ‘Сотниця’, ‘Гілея’, ‘Золотоколоса’, ‘Фаворитка’, ‘Смуглянка’) був присутній цей поліморфний фрагмент.

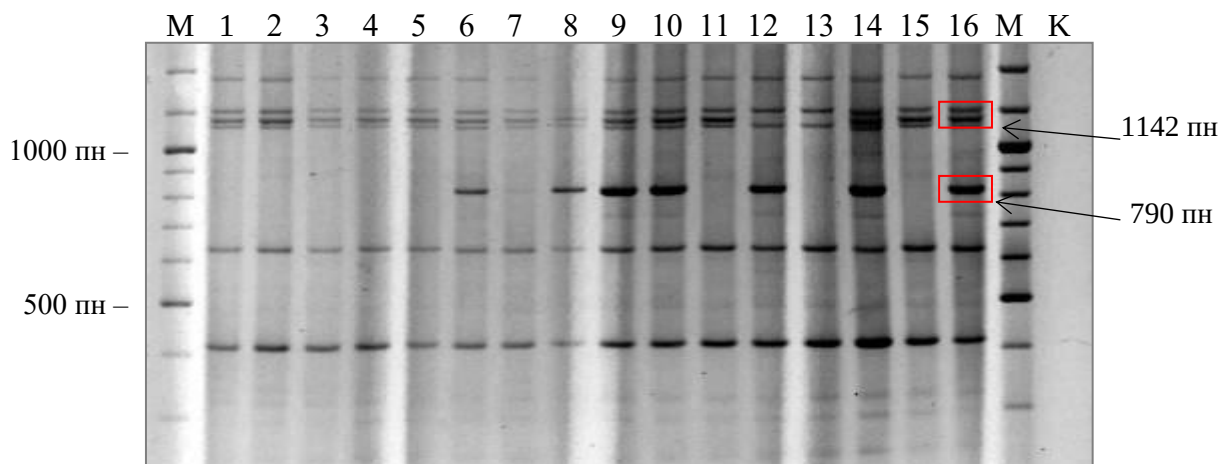


Рис. 7.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці з праймерами до ретротранспозонів Sabrina+Wham. Доріжка 1 – сорт ‘Переяславка’; 2 – ‘Подольянка’; 3 – ‘Ятрань 60’; 4 – ‘Наталка’; 5 – ‘Крижинка’; 6 – ‘Веснянка’; 7 – ‘Богдана’; 8 – ‘Славна’; 9 – ‘Спасівка’; 10 – ‘Сотниця’; 11 – ‘Гілея’; 12 – ‘Щедрівка Київська’; 13 – ‘Малинівка’; 14 – ‘Золотоколоса’; 15 – ‘Фаворитка’; 16 – ‘Смуглянка’; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix; К – негативний контроль, без ДНК.

До окремої субкластерної групи увійшли всі сорти, що не містять пшенично-житню транслокацію (сорти ‘Наталка’, ‘Богдана’, ‘Ятрань 60’, ‘Переяславка’, ‘Подольянка’), або містять 1BL.1RS транслокацію (сорти ‘Крижинка’ та ‘Фаворитка’), окрім одного сорту ‘Щедрівка Київська’, що склав окрему субкластерну групу. Сорти, що містять 1AL.1RS транслокацію також склали окрему субкластерну групу. Лише сорт ‘Веснянка’ з цією транслокацією не належить до даної групи, а складає окремий кластер.

За результатами (табл. 7.1) було побудовано філогенетичне дерево родинних зв’язків досліджуваних сортів. З рис. 7.2 видно, що сорт ‘Веснянка’ виділився в окремий кластер, що свідчить про його значну віддаленість від решти сортів за результатами аналізу поліморфізму ділянок ДНК між ретроелементами. В іншому кластері сорт ‘Щедрівка Київська’ склав окрему

субкластерну групу. Сорти ‘Спасівка’ та ‘Сотниця’ є подібними за отриманими результатами.

Таблиця 7.1

Наявність поліморфних фрагментів ДНК у різних сортів пшениці

Сорт	Sukkula+ Wilma			Sukkula+ Nikita						Sukkula+ Wis2				Sukkula+ Sabrina			Sk+ S		Sabrina+ Wham			Sukkula				S + Wi
	179	214	469	539	403	261	144	807	615	227	243	258	476	205	605	719	730	506	528	783	719	261	320	196	578	565
Богдан а	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Веснянка	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Гілея	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Золото колоса	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
Крижинка	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Малинівка	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Наталка	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
Переяславка	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Подоланка	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+
Славна	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Смуглянка	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Сотниця	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Спасівка	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Фаворитка	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Щедр. Київ.	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Ятрань 60	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+

Примітки: «+» – наявність, «-» – відсутність поліморфних фрагментів; S – Stowaway, Wi – Wilma, Sk – Sukkula; Щедр. Київ. – ‘Щедрівка Київська’. Розміри дано у п.н.

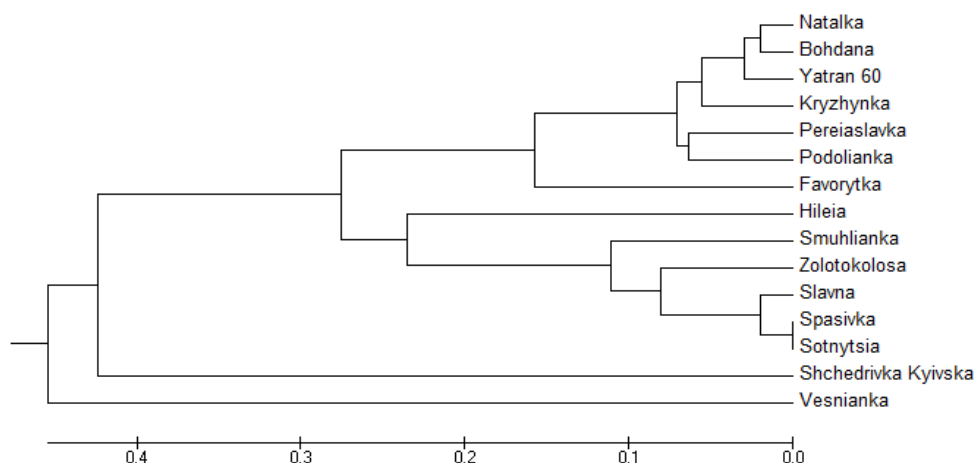


Рис. 7.2. Філогенетичне дерево побудоване за результатами IRAP-аналізу.

7.1.2. Дослідження генетичного різноманіття *T. spelta* за допомогою IRAP-маркерів

Дослідження генетичного різноманіття проводили з використанням 9 маркерних систем: Sukkula, Sukkula+Nikita, Sukkula+Wham, Sabrina+Wham, Sukkula+Wis2, Stowaway+Wilma, Sukkula+Sabrina, Sukkula+Stowaway, Sukkula+Wilma. Вивчали зразки спельти: *Triticum spelta* 5 УК 5C/15, *T. spelta* ‘Зоря України’, *T. spelta* 2 УК 2C/15, *T. spelta* 3 УК 3C/15, *T. spelta* 4 УК 4C/15, *T. spelta* 8/14 УК 8C/14, *T. spelta* 7/14 УК 7C/14, *T. spelta* ‘Oberkulmer Rothkorn’ УК 19C/15, *T. spelta* ‘Frankenkorn’ УК 9C/15, *T. spelta* ‘Baulaender’ УК 11C/15.

На рис. 7.3 та 7.4 представлені типові електрофореграми розділення продуктів ампліфікації з маркерними системами на основі IRAP. Зразки 1–3, 10–12 мають поліморфний фрагмент розміром 1142 п.н. (рис. 7.3). Ці зразки представлені двома сортами пшениці та решта – спельта. Поліморфний фрагмент розміром 790 п.н. присутній у всіх 10 зразках спельти, у зразках пшениці – відсутній.

При постановці ПЛР з маркерною системою Sukkula+Nikita було виявлено 5 поліморфних фрагментів (рис. 7.4). Фрагменти розміром 420, 780, 1157 п.н. присутні лише у зразків пшениці (доріжки 1 та 2). Фрагмент

797 п.н. – у всіх десяти зразків спельти. Лише у зразка на доріжці 12 (*T. spelta* ‘Baulaender’ УК 11C/15) відсутній фрагмент розміром 157 п.н.

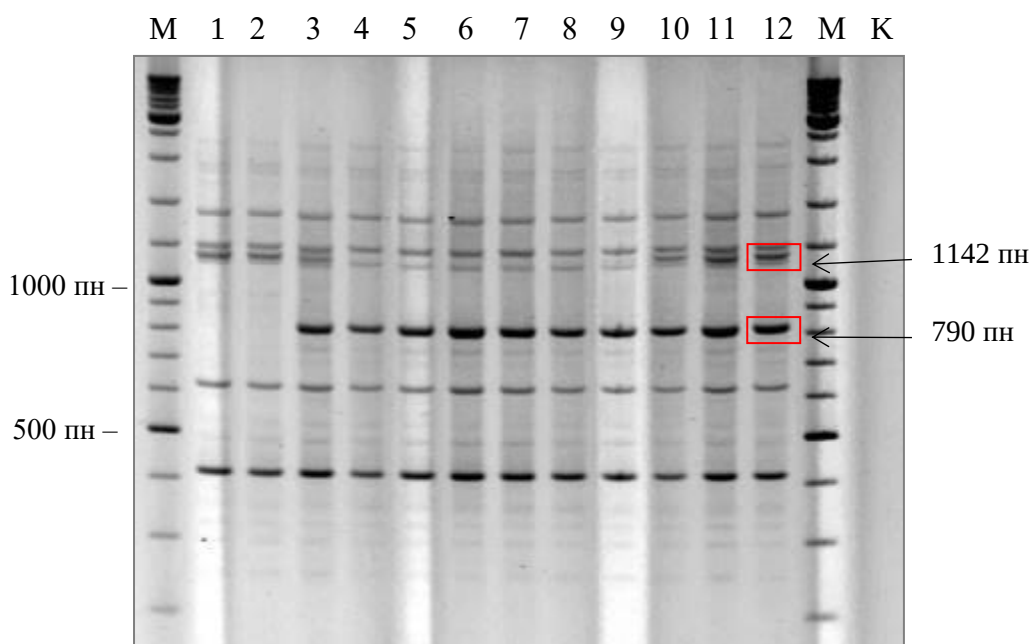


Рис. 7.3. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці та спельти з праймерами до ретротранспозонів системи Sabrina+Wham. Доріжка 1 – пшениця, сорт ‘Ятрань 60’; 2 – пшениця, сорт ‘Подільська’; 3 – *T. spelta* 5 УК 5C/15; 4 – *T. spelta* ‘Зоря України’; 5 – *T. spelta* 2 УК 2C/15; 6 – *T. spelta* 3 УК 3C/15; 7 – *T. spelta* 4 УК 4C/15; 8 – *T. spelta* 8/14 УК 8C/14; 9 – *T. spelta* 7/14 УК 7C/14; 10 – *T. spelta* ‘Oberkulmer Rothkorn’ УК 19C/15; 11 – *T. spelta* ‘Frankenkorn’ УК 9C/15; 12 – *T. spelta* ‘Baulaender’ УК 11C/15, К – негативний контроль, без додавання ДНК; М – маркер молекулярної маси.

При обробці отриманих електрофореграм були встановлені загальна кількість ампліфікованих фрагментів, кількість поліморфних фрагментів, кількість мономорфних фрагментів, а також відсоток поліморфізму окремої маркерної системи. Дані згруповані та представлені у табл. 7.2.

Найбільш інформативними виявились системи Sukkula+Wis2 (35,7 %), Sukkula+Nikita (28,6 %) та Sukkula (27,3 %). Виявлені поліморфні фрагменти в ході IRAP-аналізу з 9-ма маркерними системами представлені в табл. 7.3.

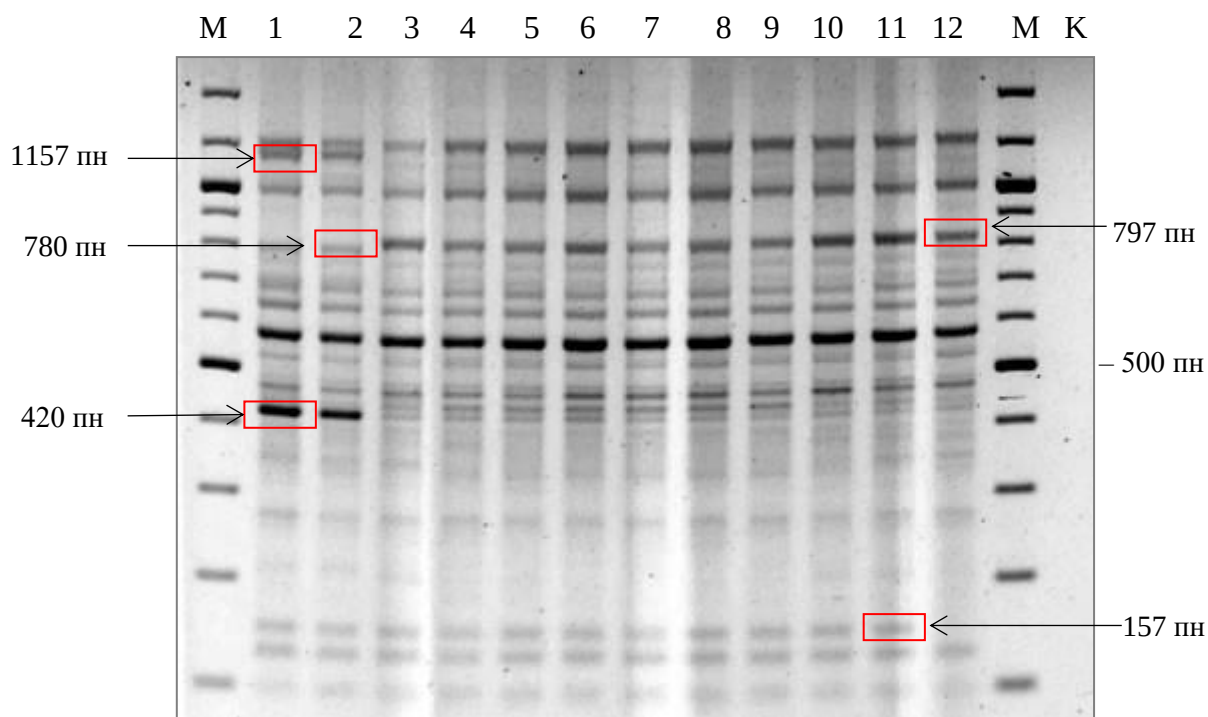


Рис. 7.4. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці та спельти з праймерами до ретротранспозонів Sukkula+Nikita. Доріжки: 1 – сорт ‘Ятрань 60’; 2 – ‘Подільська’; 3 – 5 УК 5С/15; 4 – ‘Зоря України’; 5 – 2 УК 2С/15; 6 – 3 УК 3С/15; 7 – 4 УК 4С/15; 8 – *T. spelta* 8/14 УК 8С/14; 9 – *T. spelta* 7/14 УК 7С/14; 10 – *T. spelta* ‘Oberkulmer Rothkorn’ УК 19С/15; 11 – *T. spelta* ‘Frankenkorn’ УК 9С/15; 12 – *T. spelta* ‘Baulaender’ УК 11С/15, К – негативний контроль, без додавання ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Таблиця 7.2

Характеристика різних маркерних систем за IRAP-аналізу генотипів пшениці та спельти

Маркерна система	Загальна кількість ампліфікованих фрагментів, шт	Кількість поліморфних фрагментів, шт	Кількість мономорфних фрагментів, шт	% поліморфізму
Sabrina+Wham	10	2	8	20,0
Stowaway+Wilma	22	5	18	22,7
Sukkula	11	3	8	27,3
Sukkula+Nikita	14	4	10	28,6
Sukkula+Sabrina	12	2	10	16,7
Sukkula+Stowaway	16	3	13	18,8
Sukkula+Wham	22	4	18	18,2
Sukkula+Wilma	20	2	18	10,0
Sukkula+Wis2	14	5	9	35,7

За отриманими результатами було побудоване філогенетичне дерево родинних зв'язків досліджуваних зразків пшениці та спельти (рис. 7.5) за допомогою програмного забезпечення MEGA 6.0 за використанням UPGMA

методу. Розглядаючи дану дендрограму бачимо, що два зразки пшениці – сорти ‘Подільська’ та ‘Ятрань 60’ склали окрему кластерну групу. Всі зразки спельти склали окремий кластер, причому, для 5-ти зразків спельти (№ 2, 3, 4, 8/14 та сорт ‘Зоря України’) та 2-х (№ 5 та сорт ‘Frankenkorn’) не вдалось встановити генетичну відмінність.

Таблиця 7.3

Наявність поліморфних фрагментів виявлених у ході IRAP-аналізу в досліджуваних зразках спельти та пшениці

Зразки	Sabrina/ Wham	Stowaway /Wilma	Suk- kula	Sukkula/ Nikita	Sukkula/ Sabrina	Sukkula/ Stowaway	Sukkula/ Wham	Sukkula/ Wilma	Sukkula/ Wis2
Довжина фрагментів, п.н.									
<i>T. aestivum</i> сорт Ятрань 60	1142	368 411 540 708	338	157 420 780 1157	528	531 1172	122 871	168 521	285 546 915
<i>T. aestivum</i> сорт Подільська	1142	368 540 708	338	157 420 780 1157	528	531 1172	122 871	168 521	130 915
<i>T. spelta</i> 5 УК 5С/15	790 1142	411 616	338 376 1096	157 797	403	328	112 280	168	130 285 354 480
<i>T. spelta</i> Зоря України	790	411 616	376 1096	157 797	528	531	122 280	168 521	130 285 354 480 915
<i>T. spelta</i> 2 УК 2С/15	790	411 616	376 1096	157 797	528	531	122 280	168 521	130 285 354 480 915
<i>T. spelta</i> 3 УК 3С/15	790	411 616	376 1096	157 797	528	531	122 280	168 521	130 285 354 480 915
<i>T. spelta</i> 4 УК 4С/15	790	411 616	376 1096	157 797	528	531	122 280	168 521	130 285 354 480 915
<i>T. spelta</i> 8/14 УК 8С/14	790	411 616	338 376 1096	157 797	528	531	122 280	168 521	130 285 354 480, 915
<i>T. spelta</i> 7/14 УК 7С/14	790	411 616	338 376 1096	157 797	528	531	122 280	168 521	130 285 354 480, 915
<i>T. spelta</i>	790	411	338	157	403	328	112	168	130

Зразки	Sabrina/ Wham	Stowaway /Wilma	Suk- kula	Sukkula/ Nikita	Sukkula/ Sabrina	Sukkula/ Stowaway	Sukkula/ Wham	Sukkula/ Wilma	Sukkula/ Wis2
Довжина фрагментів, п.н.									
Oberkulmer Rothkorn УК 19С/15	1142	616	376 1096	797		531	280		285 354 480
<i>T. spelta</i> Frankenkorn УК 9С/15	790 1142	411 616	338 376 1096	157 797	403	328	112 280	168	130 285 354 480
<i>T. spelta</i> Baulaender УК 11С/15	790 1142	368 411 616	338 1096	797	403 528	328 531	112 280	521	130 285 354 480

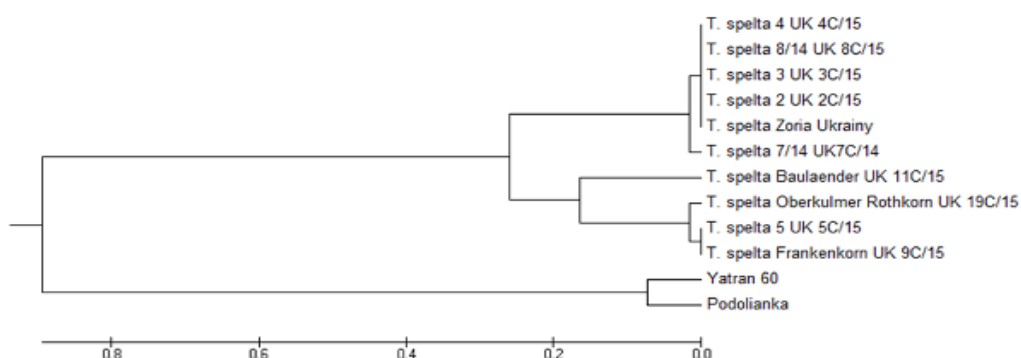


Рис. 7.5. Філогенетичне дерево родинних зв'язків досліджуваних зразків пшениці та спельти побудоване за результатами IRAP-аналізу.

7.1.3. Дослідження генетичного різноманіття сортів *H. vulgare* за допомогою IRAP-маркерів

У результаті проведення експериментальної роботи ми дослідили ефективність визначення поліморфізму міжретротранспозонних ділянок ячменю з використанням праймерів до його ретротранспозонів. Вивчали сорти ячменю: 'Барка', 'Беатрикс', 'Геліус', 'Гладіс', 'Джарзей', 'Ебсон', 'Скарлет'. В якості контролю проходження реакцій використовували ДНК пшениці сорту 'Золотоколоса'. Основними критеріями вибору оптимальних IRAP-маркерів були наявність поліморфізму, достатня кількість інтенсивних ампліконів (5–15 ампліконів на доріжку), можливість ефективного розділення і візуалізації ампліконів. Типові електрофореграми ефективних IRAP-маркерів наведено на рис. 7.6–7.8.

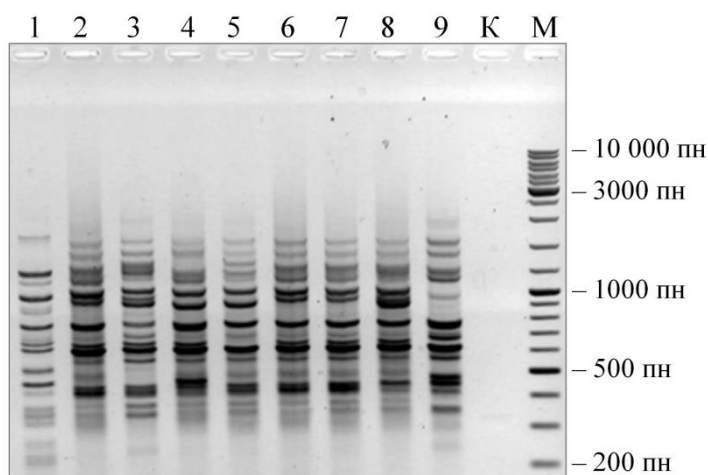


Рис. 7.6. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК сортів ячменю з праймерами до ретротранспозону Sukkula. Доріжка 1 – пшениця сорт ‘Золотоколоса’; 2–9 – ячмінь ‘Барка’, ‘Беатрикс’, ‘Геліус’, ‘Гладіс’, ‘Джарзей’, ‘Ебсон’, ‘Скарлет’; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

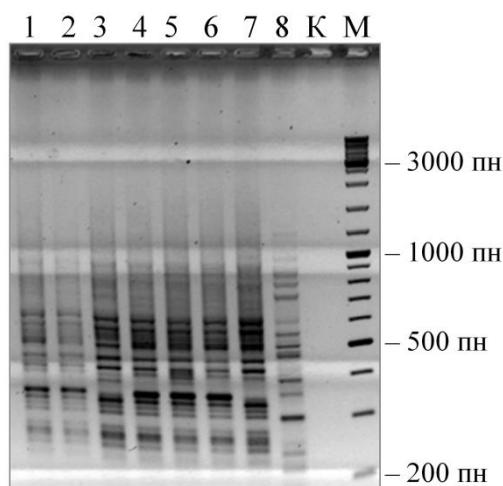


Рис. 7.7. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів ячменю з праймерами до ретротранспозонів Sukkula та Wilma07. Доріжки 1–7 – ‘Барка’, ‘Беатрикс’, ‘Геліус’, ‘Гладіс’, ‘Джарзей’, ‘Ебсон’, ‘Скарлет’; 8 – пшениця ‘Золотоколоса’; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

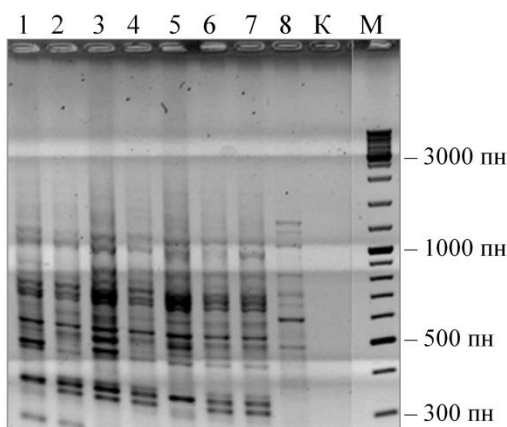


Рис. 7.8. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів ячменю з праймерами до ретротранспозонів Sukkula та Nikita. Доріжки 1–7 – ‘Барка’, ‘Беатрикс’, ‘Геліус’, ‘Гладіс’, ‘Джарзей’, ‘Ебсон’, ‘Скарлет’; 8 – пшениця ‘Золотоколоса’; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

З електрофореграм видно, що праймери до ретротранспозону Sukkula дозволяють детектувати достатню кількість мономорфних та поліморфних ампліконів. Комбінування праймерів до ретротранспозону Sukkula з праймерами до інших ретротранспозонів (Wilma07, Nikita) дозволяє отримувати нові поліморфні амплікони. Це свідчить про достатню ефективність цих трьох реакцій для визначення генетичного поліморфізму ячменю.

Проте, ми визначили низьку ефективність ретротранспозонів Wis2, Stowaway, Stowaway+Wilma07, Wham та їх комбінацій. Разом з тим, для ретротранспозону Stowaway для поліпшення реакції доцільним буде в наступних дослідженнях оптимізувати реакцію або використовувати його у комбінаціях нових ретротранспозонів. Для решти ретротранспозонів спостерігали або недостатню кількість ампліконів, або їх низьку інтенсивність. Необхідно також відмітити, що досліджені IRAP-маркери дозволяють відрізнати генотипи пшениці й ячменю.

7.1.4. Дослідження мутантних ліній тритикале з використанням IRAP-маркерів

Для отримання ліній тритикале зі зміненим складом крохмалю в зерні проводилася робота за двома напрямками: маркер-опосередкована селекція зразків після схрещування вихідного сорту тритикале із сортом ваксі пшениці 'Софійка' для контролю перенесення нуль-алелів пшеничних *waxy*-генів та проведення хімічного мутагенезу для отримання рослин тритикале із мутантним геном *GBSSI*, який відповідає за синтез амілози у геномі жита. Для підтвердження змін в геномі тритикале під дією хімічних мутагенів було проведено аналіз зеленої маси отриманих можливих мутантних рослин за використання IRAP-маркерів. Досліджуваним матеріалом виступали вихідний сорт тритикале та мутанти, отримані після проведення хімічного

мутагенезу. Хімічний мутагенез здійснювали за використання розчинів нітрозоетилсечовини та нітрозометилсечовини у різних концентраціях, рекомендованих у літературних джерелах.

Ряд апробованих праймерів дозволив чітко відрізнити окремі рослини, геном яких зазнав суттєвих змін після обробки нітрозометилсечовиною та нітрозоетилсечовиною. Типові електрофореграми наведені на рис. 7.9 і 7.10. Можна чітко спостерігати, що зразок 12 суттєво відрізняється як від вихідної лінії тритикале, так і від мутантних рослин, отже він є потенційно-перспективним для проведення подальших досліджень цільового гена.

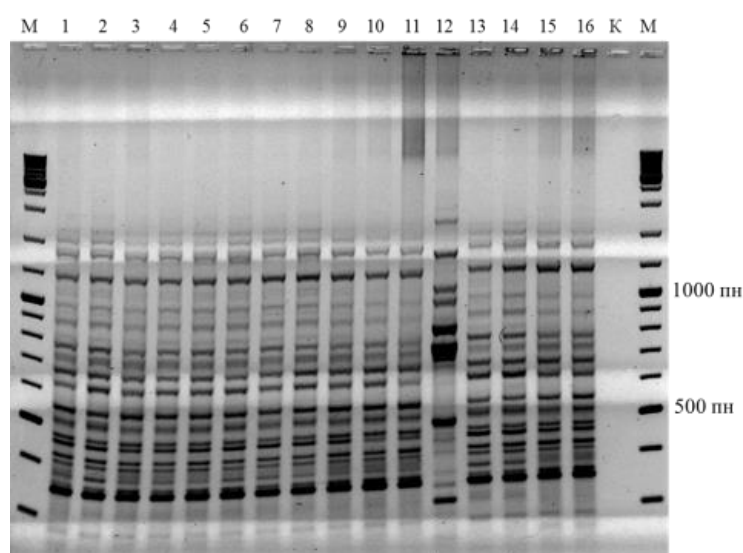


Рис. 7.9. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК мутантних рослин тритикале з праймерами до ретротранспозону Sukkula. Доріжки 1–12 – досліджувані мутантні рослини тритикале; 13–16 – вихідний сорт тритикале, який піддавався обробці хімічними мутагенами; К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

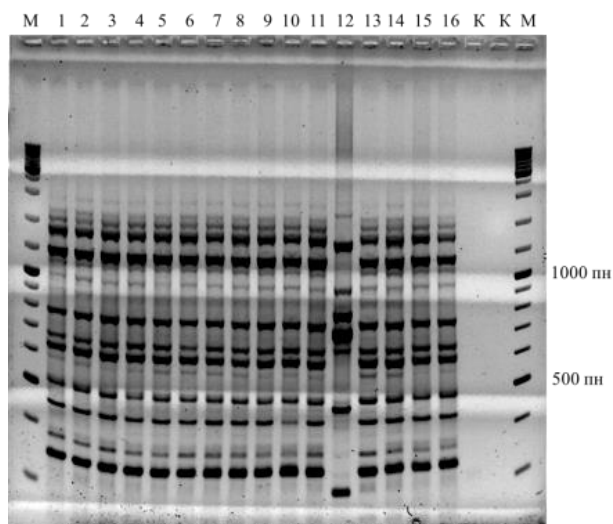


Рис. 7.10. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК мутантних рослин тритикале з праймерами до ретротранспозонів Sukkula та Stowaway. Доріжки 1–12 – досліджувані мутантні рослини тритикале; 13–16 – вихідний сорт тритикале, який піддавався обробці хімічними мутагенами; К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

7.1.5. Визначення поліморфізму ДНК різних сортів пшениці з використанням REMAP-маркерів

На сьогодні перспективно встановлювати генетичний поліморфізм досліджуючи рослинний геном з використанням REMAP-маркерів, які дають можливість детектувати поліморфні локуси ДНК між ретротранспозонами та мікросателітними локусами (Kalendar, 2011; Kunkeaw et al., 2011). Полілокусні системи, в тому числі REMAP, дозволяють дослідити у порівняльному аналізі значну кількість локусів, що представляють усі фракції генома (Smýkal et al., 2011). Завданням даної частини роботи було розробити ефективні молекулярно-генетичні системи на основі аналізу поліморфізму послідовностей ДНК між ретротранспозонами та мікросателітними локусами.

У результаті проведення експериментальної роботи ми дослідили ефективність визначення поліморфізму ДНК різних сортів пшениці з використанням REMAP-маркерів. Типові електрофореграми розділення продуктів ампліфікації представлені на рис. 7.11 та 7.12. Виявлено, що

найефективнішими розробленими системами є Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10 (табл. 7.4). Для системи Sukkula+HB10 отримали 10 ампліфікованих фрагментів, серед яких 5 поліморфних. Відсоток поліморфізму становив 50 %. Для системи Sukkula+A17898 було отримано 13 ампліфікованих фрагментів, з яких 3 поліморфні, а поліморфізм становив 23,07 %. Наявність поліморфних фрагментів у досліджуваних зразках, що детектувались за допомогою розроблених REMAP-систем, представлені в табл. 7.5.

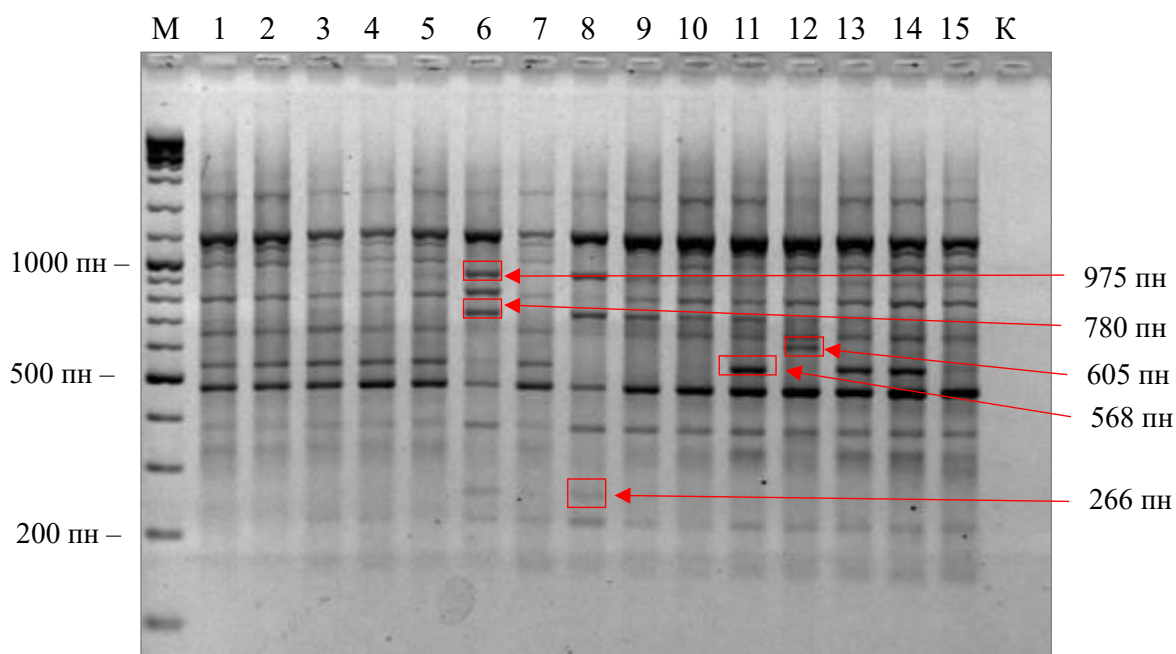


Рис. 7.11. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці в REMAP-системі Sukkula+HB10. Доріжки 1 – сорт ‘Переяславка’; 2 – ‘Подільська’; 3 – ‘Ятрань 60’; 4 – ‘Наталка’; 5 – ‘Крижинка’; 6 – ‘Веснянка’; 7 – ‘Богдана’; 8 – ‘Славна’; 9 – ‘Спасівка’; 10 – ‘Сотниця’; 11 – ‘Гілея’; 12 – ‘Щедрівка Київська’; 13 – ‘Золотоколоса’; 14 – ‘Фаворитка’; 15 – ‘Смуглянка’; К – негативний контроль без внесення ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

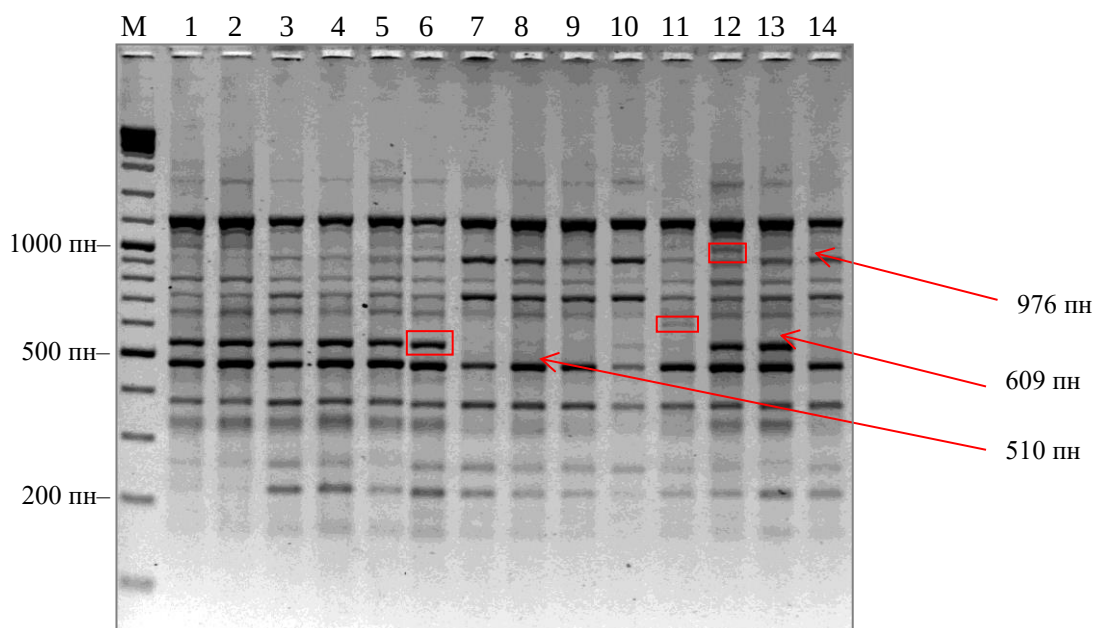


Рис. 7.12. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці в системі REMAP Sukkula+A17898. Доріжки 1 – сорт ‘Переяславка’; 2 – ‘Подільянка’; 3 – ‘Ятрань 60’; 4 – ‘Наталка’; 5 – ‘Крижинка’; 6 – ‘Богдана’; 7 – ‘Славна’; 8 – ‘Спасівка’; 9 – ‘Сотниця’; 10 – ‘Гілея’; 11 – ‘Щедрівка Київська’; 12 – ‘Золотоколоса’; 13 – ‘Фаворитка’; 14 – ‘Смуглянка’; К – сорт негативний контроль без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Таблиця 7.4

Кількість фрагментів, які були отримані в ході розділення продуктів ампліфікації ДНК в системах REMAP

Маркерна система	Загальна кількість ампліфікованих фрагментів, шт	Кількість поліморфних фрагментів, шт	Кількість мономорфних фрагментів, шт	% поліморфізму*
Sukkula+HB10	10	5	5	50,00
Sukkula+A17898	13	3	10	23,07
Sukkula+B17899	12	3	9	25,00
Sukkula+IS-05	8	2	6	25,00
Sukkula+UBC890	11	2	9	18,18

Примітка: *Відсоткове співвідношення кількості поліморфних фрагментів до загальної кількості ампліфікованих фрагментів.

За результатами ПЛР-аналізу було побудовано філогенетичне дерево (рис. 7.13) у програмному забезпеченні DARwin 6.0 за використанням методу Test-Neighbor-Joiningtree. Отримана дендограма складається з двох кластерів, які поділяються на субкластери.

До першого входять сорти: ‘Гілея’, ‘Фаворитка’, ‘Крижинка’, ‘Богдана’, ‘Золотоколоса’, ‘Наталка’, ‘Ятрань 60’, ‘Переяславка’, ‘Подольська’. До другого кластера входять: ‘Щедрівка Київська’, ‘Сотниця’, ‘Смуглянка’, ‘Веснянка’, ‘Славна’, ‘Спасівка’.

Таблиця 7.5

Наявність поліморфних ампліконів у досліджуваних сортах пшениці

Сорт	Sukkula+ HB10					Sukkula+ A17898			Sukkula+ B17899				Sukkula+ UBC890		Sukkula+ IS-05	
	266	568	605	780	975	510	609	976	201	292	302	695	285	601	303	997
Богдана	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Веснянка	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Гілея	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Золото- колоса	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Крижинка	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Наталка	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Переяслав- ка	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Подольська	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Славна	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Смуглянка	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Сотниця	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Спасівка	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Фаворитка	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Щедрівка Київська	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
Ятрань 60	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-

Примітка: Наявність (+) або відсутність (-) поліморфних фрагментів у проаналізованих сортах пшениці. Довжина ампліконів вказана у п.н.

В ході REMAP-аналізу за використання 5 маркерних систем була встановлена подібність генотипів сортів ‘Ятрань 60’ і ‘Наталка’ та ‘Славна’ і ‘Спасівка’. Таким чином, проведено розробку системи оцінки генетичного поліморфізму сортів пшениці та спельти на основі аналізу ділянок ДНК між ретроелементами. Розроблено дев’ять систем на основі IRAP, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами. Досліджено генетичне різноманіття генотипів м’якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами та показано рівень генетичної відмінності між

досліджуваними сортами цих видів. Можна зробити припущення, що зразки *T. spelta* 2, 3 та 8/14 є близькими до українського сорту ‘Зоря України’.

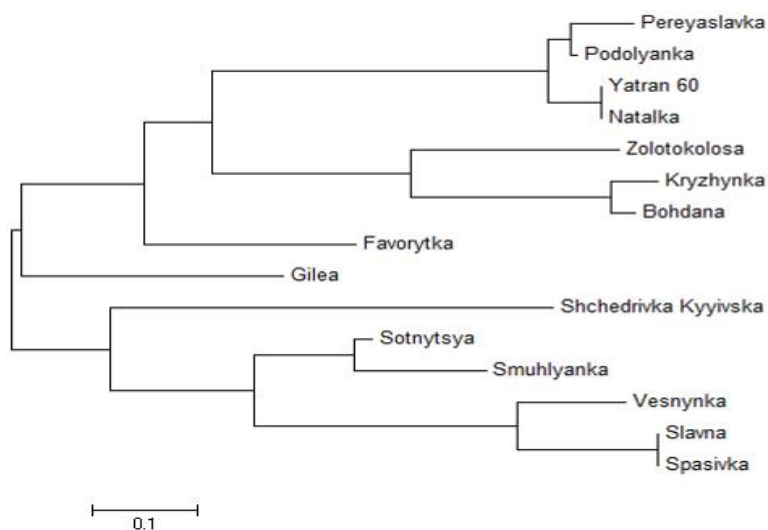


Рис. 7.13. Філогенетичне дерево побудоване за результатами REMAP-аналізу ДНК профілей сортів пшениці м'якої озимої.

Показана висока ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону Sukkula як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів Wilma07 і Nikita у дослідженнях геному ячменю. Виявлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10.

Підібрані нами маркерні системи і праймери дозволяють ефективно виявляти внутрішньовидову мінливість у сортів різних злакових культур і можуть бути використані в подальших селекційних дослідженнях для їх поліпшення із застосуванням методів молекулярних маркерів. Мономорфні фрагменти, що виявляються при електрофорезі продуктів ПЛР у сортів різних злаків, чіткіше позначають спільність структурно функціональної організації їх геномів. При цьому кожен з вивчених сортів має свій певний спектр ампліфікованих IRAP та REMAP продуктів (фрагментів), що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. Аналіз отриманих результатів, представлених у вигляді дендрограми

коефіцієнтів генетичної схожості, показав, що вивчені сорти характеризуються порівняно високим рівнем міжсортного поліморфізму.

Аналіз міжвидової (міжгеномної) спорідненості має значення не тільки для вирішення питань філогенії і систематики, але, головним чином, для селекції, що базується на методах віддаленої гібридизації.

7.2. Системи ДНК-маркерів для генотипування пшениці

7.2.1. Розробка способів маркування функціонального алеля *Gpc-B1*

На пшеницю припадає 25 % світового білкового харчування, також, вона являється важливим джерелом мікроелементів (Shewry, 2009). Тому, якість пшениці стає однією з основних характеристик селекційних програм, що також пов'язано з більш високими стандартами споживачів, імпортерів, виробників. Підвищення вмісту білка в зерні (GPC – grain protein content) є важливим напрямом селекції пшениці, так як від цього залежить якість хліба, макаронів, тістечок та висока поживна цінність продуктів.

Проте складність у процесі підвищення в зерні вмісту білка – це високий екзогенний ефект і громіздкість комплексу генетичних систем, що регулюють цю ознаку (Simmonds, 1995). Особливий інтерес у даному напрямку представляє ген *Gpc-B1*, що розташований на хромосомі 6BS (Olmos et al., 2003), який збільшує накопичення білка (в середньому 14 г на кг) у гексаплоїдній та тетраплоїдній пшениці в різних кліматичних умовах (Jorpa et al., 1997; Olmos et al., 2003). Вперше ген *Gpc* був ідентифікований в дикій полбі *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Вчені Йопа і співавтори (Jorpa et al., 1990) у 1990 році шляхом заміщення 6В хромосоми сорту 'Langdon' на гомологічну хромосому з *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*, довели, що корисний ген знаходиться на хромосомі 6В полби.

Ген *Gpc-B1* також відповідає за прискорене старіння листя та зумовлює ефект підвищеної концентрації у зерні пшениці важливих мікроелементів таких як Zn, Mn та Fe (Рибалка, 2012). Ефект локусу було ретельно вивчено

та показано суттєве збільшення у порівнянні з вихідною лінією вмісту в зерні цинку (60 мг/кг проти 47,5 мг/кг), заліза (44,2 мг/кг проти 35,9 мг/кг), марганцю (53,9 мг/кг проти 40,9 мг/кг) та білка (14,4 % проти 10,8 %) (Uauy et al., 2006; Tabbita et al., 2013).

Завданням нашого дослідження було охарактеризувати генотипи з геном *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* в геномі пшениці м'якої озимої *T. aestivum* сорту 'Куяльник', районованого в Україні, шляхом встановлення факту рекомбінації між хромосомами 6В *T. aestivum* і *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Матеріалом дослідження було насіння гібридних сімей F₃–F₅ поколінь, отримане від схрещування сорту 'Куяльник' та заміщеної лінії Glupro донору ознаки на основі сорту 'Langdon'. Методика електрофорезу глютенінів в ПАГ, що використовувалася для дослідження, представлена у розділі 2.3.8, особливості виконання полімеразних ланцюгових реакцій у розділі 2.3.4.

Одним із етапів роботи була розробка системи визначення вмісту запасних білків пшениці за допомогою поліакриламідних гелів. Дослідними зразками були гібридні сім'ї F₄ носії гена *Gpc-B1*. Батьківськими формами були сорт 'Куяльник' і лінія-донор. Для сорту 'Куяльник' по глютенінам характерні такі білкові субодиниці як *Glu-A1b*(2*), *Glu-B1a1*(77+8), *Glu-D1d*(5+10), для лінії-донора – *Glu-A1a*(1), *Glu-B1d*(6+8) (рис. 7.14).

При відборі гібридних ліній необхідно обирати лінії, що несуть білкові субодиниці від сорту 'Куяльник', так як даний сорт має одні із найсильніших алелів *Glu-D1d*(5+10), *Glu-B1a1*(77+8), *Glu-A1b*(2*), які позитивно впливають на якість борошна, тоді як лінія-донор, створена на основі сорту 'Langdon', має *Glu-B1d*(6+8), *Glu-A1a*(1), що негативно впливають і знижують якість хлібопекарського борошна.

Фракції гліадинів досліджувалися на гібридних сім'ях F₄ покоління носіїв гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Батьківськими формами були сорт 'Куяльник' і лінія-донор. Для сорту 'Куяльник' по гліадинам

характерні такі білкові субодиниці як *Gli-1A(10)*, *Gli-1B(1)*, *Gli-1D(4)*, в той час для лінії-донора – *Gli-1A(2)*, *Gli-1B(2)* (рис. 7.15).

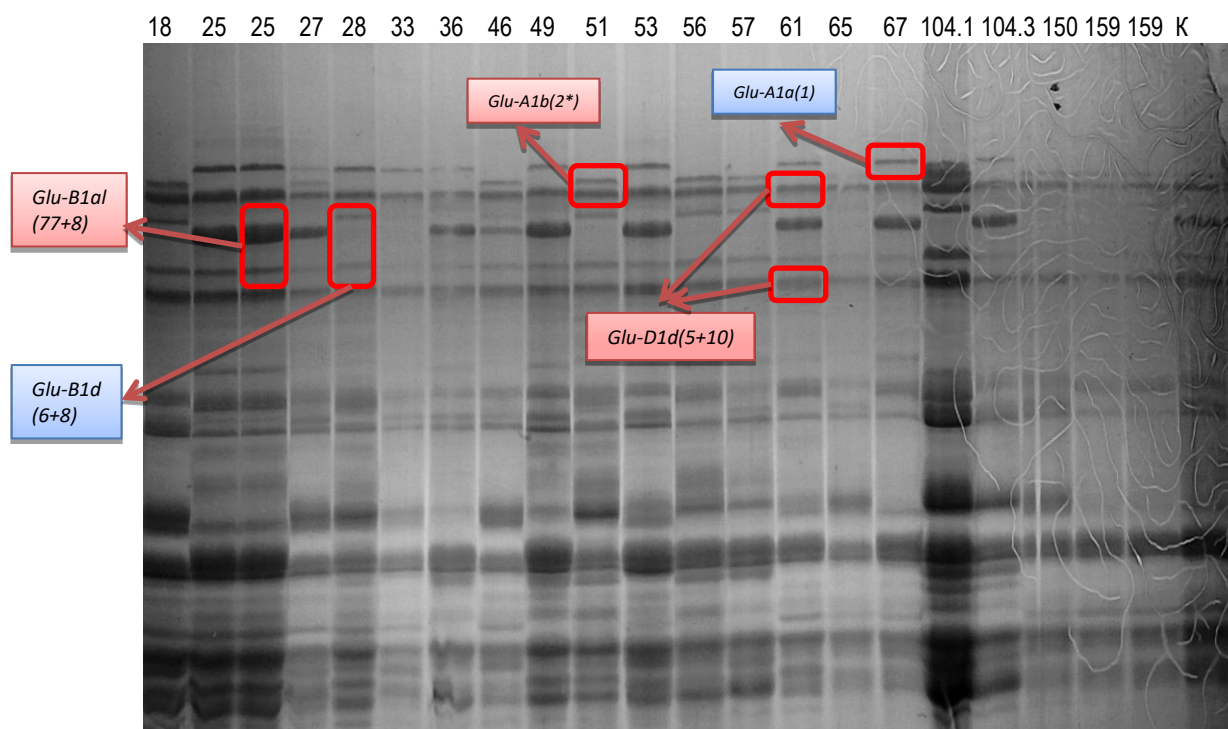


Рис. 7.14. Аналіз фракції глютенінів зернівок на електрофореграмі після розділення в SDS поліакриламідному гелі. Доріжки 18–159 – дослідні зразки; К – сорт ‘Куяльник’.

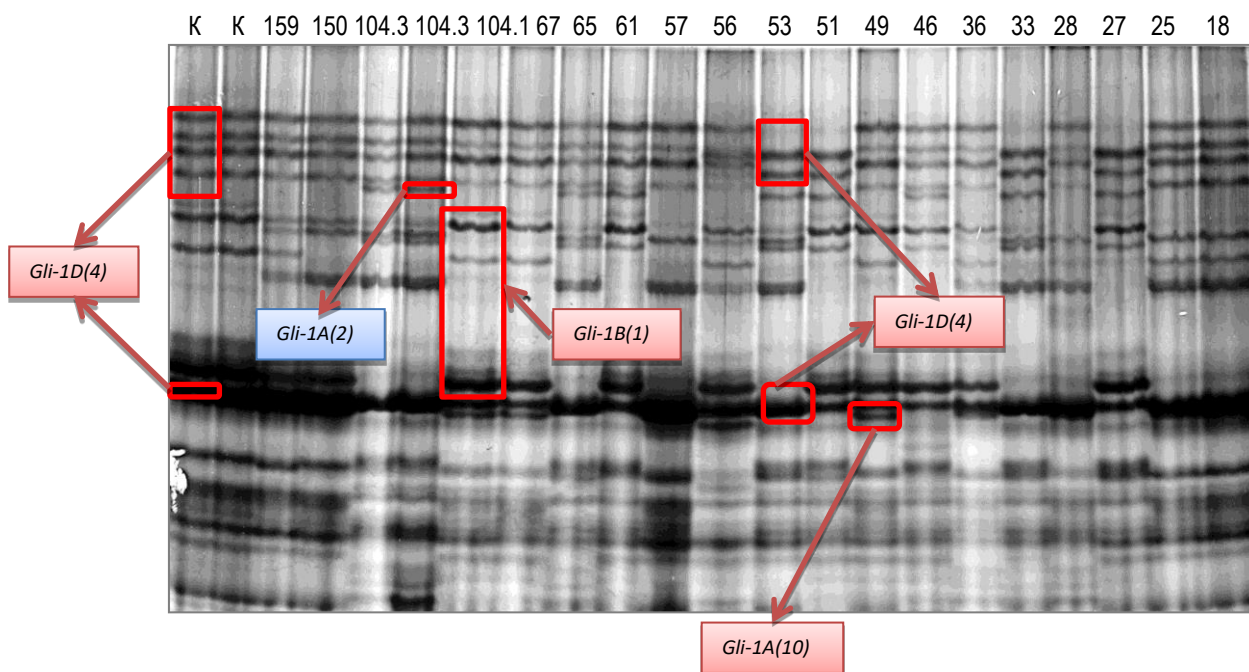


Рис. 7.15. Аналіз фракції гліадинів зернівок на електрофореграмі після розділення в кислому поліакриламідному гелі. Доріжки 159–18 – дослідні зразки відповідно; К – сорт ‘Куяльник’, вихідна форма.

Сорти пшениці, у яких присутній *Gli-1B(1)* мають якість зерна на високому рівні, тоді як присутність алелю *Gli-1A(2)* свідчить про те, що це фуражний сорт пшениці. В локусі *Gli-1D* у високоякісних сортів найчастіше присутній алель *Gli-1D(4)*. Таким чином, необхідною умовою створення сильної хлібопекарської пшениці є присутність у генотипі сорту таких алелів гліадинкодуєчих локусів як *Gli-1D(4)*, *Gli-1B(1)*.

При перевірці гібридних сімей F_4 покоління, не всі лінії несли білкові субодиниці від сорту 'Куяльник', тому важливим етапом при відборі гібридних сімей пшениці була перевірка фракції гліадинів та глютенінів.

Для встановлення факту проходження рекомбінації, було розроблено чотири кодомінантні системи мікросателітних маркерів до геному пшениці, які локалізовано у різних плечах хромосоми 6В – *Xgwm193*, *Xgwm219*, *Xgwm508* та *Xgwm626*. Типові електрофореграми результатів ПЛР локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193* та *Xgwm219* наведені на рис. 7.16–7.19.

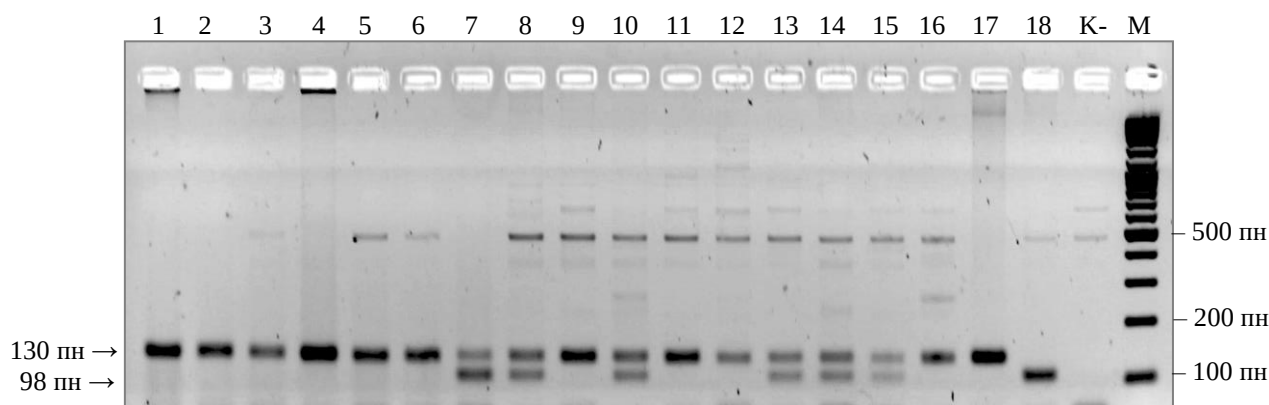


Рис. 7.16. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до локусу *Xgwm626*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – пшениця (лінія-донор), яка має заміщену 6В хромосому від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця – носій 6В хромосоми *T. aestivum*; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Довжини ампліконів дано у п.н.

Наявність алеля SSR локусу *Xgwm626* від *T. aestivum* спостерігали у ліній 526/140, 526/151, 527/52 та 527/53. Частота рекомбінації по даному локусу склала $2,98 \% \pm 1,29 \%$. Наявність алелю SSR локусу *Xgwm219* від *T. aestivum* спостерігали у ліній 526/121, 526/153, 526/156, 526/164, 527/16, 527/44, 527/52 та 527/53. Частота рекомбінації по даному локусу була $6,77 \%$

$\pm 2,08$ %. Наявність алелю SSR локусу *Xgwm508* від *T. aestivum* спостерігали у ліній 526/121, 527/14, 527/51 та 527/52. Частота рекомбінації по даному локусу склала $2,94\% \pm 1,28\%$.

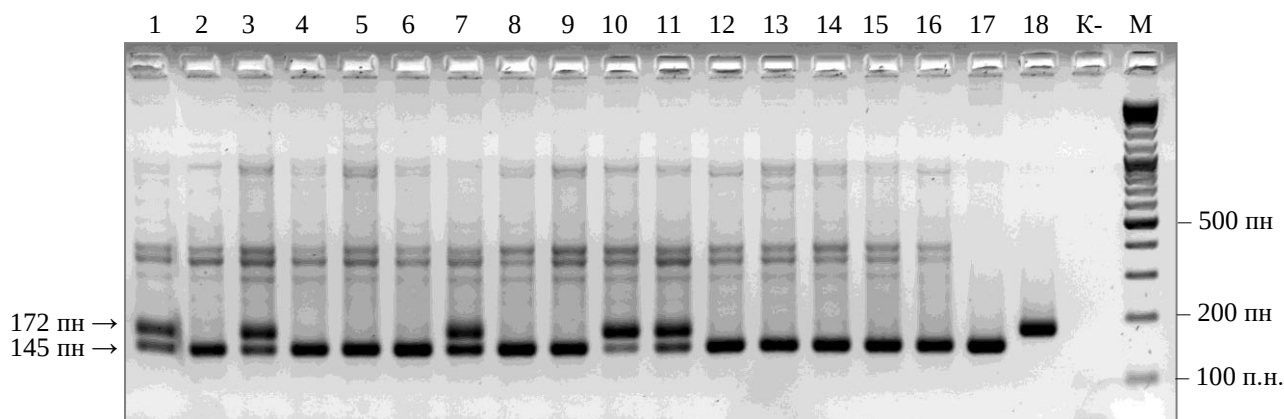


Рис. 7.17. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до локусу *Xgwm219*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – пшениці лінія-донор, яка несе заміщену 6В хромосому від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця носій 6В хромосоми *T. aestivum* L.; К- – негативний контроль (без ДНК); М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

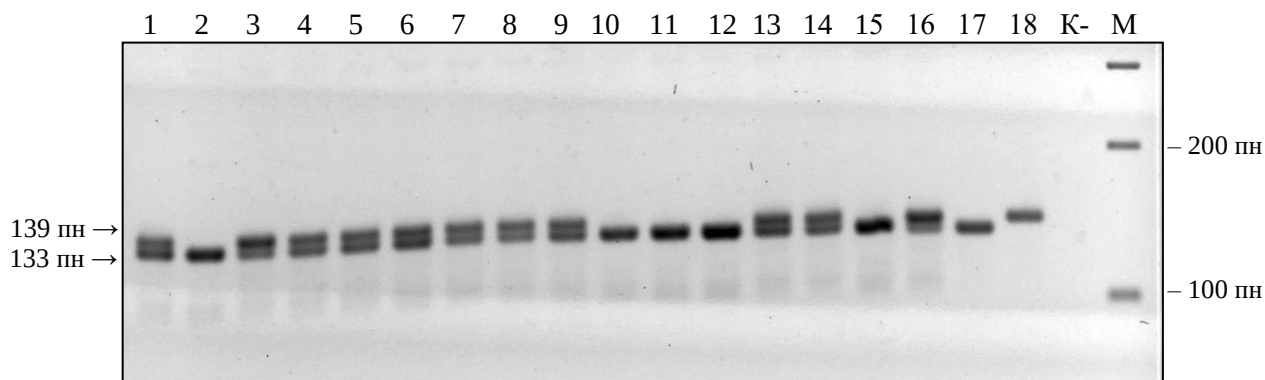


Рис. 7.18. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до локусу *Xgwm508*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, що має 6В хромосому *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця носій 6В хромосоми *T. aestivum*; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

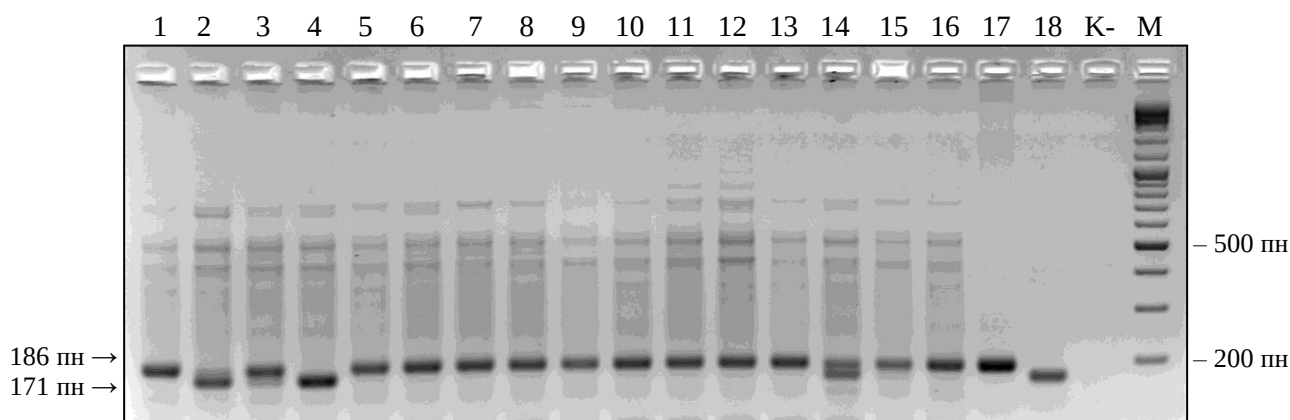


Рис. 7.19. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до локусу *Xgwm193*. Доріжки 1–16 – дослідні зразки; 17 – лінія пшениці, яка має 6В хромосому *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; 18 – м'яка пшениця носій 6В хромосими *T. aestivum*; К- – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Наявність алельного SSR локусу *Xgwm193* від *T. aestivum* спостерігали у ліній 526/121, 526/123, 526/146, 527/52 та 527/53. Частота рекомбінації по даному локусу дорівнювала $3,96 \% \pm 1,50 \%$.

Розробленими системами перевірено 81 гібридну сім'ю, позитивну за геном *Grc-B1*. Підсумкові результати наведені у табл. 7.6.

Таблиця 7.6

Наявність алельних локусів у гібридних сімей, позитивних за геном *Grc-B1*

№ гібридної сім'ї	<i>Xgwm508</i> F ₃	<i>Xgwm193</i> F ₃	<i>Xgwm219</i> F ₃	<i>Xgwm626</i> F ₃
526/120	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/121	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
526/122	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
526/123	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/124	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
526/125	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
526/126	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/128	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/129	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/131	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/132	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/134	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/135	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/136	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/140	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>
526/142	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>

№ гібридної сім'ї	<i>Xgwm508</i> F ₃	<i>Xgwm193</i> F ₃	<i>Xgwm219</i> F ₃	<i>Xgwm626</i> F ₃
526/143	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
526/144	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
526/145	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/146	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/147	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/148	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/150	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/151	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>
526/152	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/153	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
526/155	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/156	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
526/157	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/158	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/159	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/160	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/161	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/162	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/163	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/164	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/165	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/166	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/167	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/168	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/169	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/171	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/172	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/173	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/174	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/175	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/176	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/177	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/178	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
526/179	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
526/180	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/001	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/002	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/003	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/004	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/005	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/006	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/007	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/008	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/010	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/011	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/012	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/013	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/014	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>

№ гібридної сім'ї	<i>Xgwm508</i> F ₃	<i>Xgwm193</i> F ₃	<i>Xgwm219</i> F ₃	<i>Xgwm626</i> F ₃
527/015	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/016	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d</i>
527/018	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/019	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>
527/021	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/022	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/033	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/034	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/035	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/040	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/043	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/044	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/047	<i>T.d</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>
527/048	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/051	<i>T.a</i>	<i>T.d/T.a</i>	<i>T.d</i>	<i>T.d</i>
527/052	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>
527/053	<i>T.d</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>	<i>T.a</i>

Примітка: *T.d* – алельний локус від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*; *T.a* – алельний локус від *T. aestivum*; *T.d/T.a* – гетерозиготний стан, наявність двох алелів від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та від *T. aestivum*.

Найбільшу цінність представляють сім'ї, які несуть найбільше алельних локусів культурної пшениці, зберігаючи чужинний ген *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*. Перспективними є сім'ї 527/052, 527/05, 526/121.

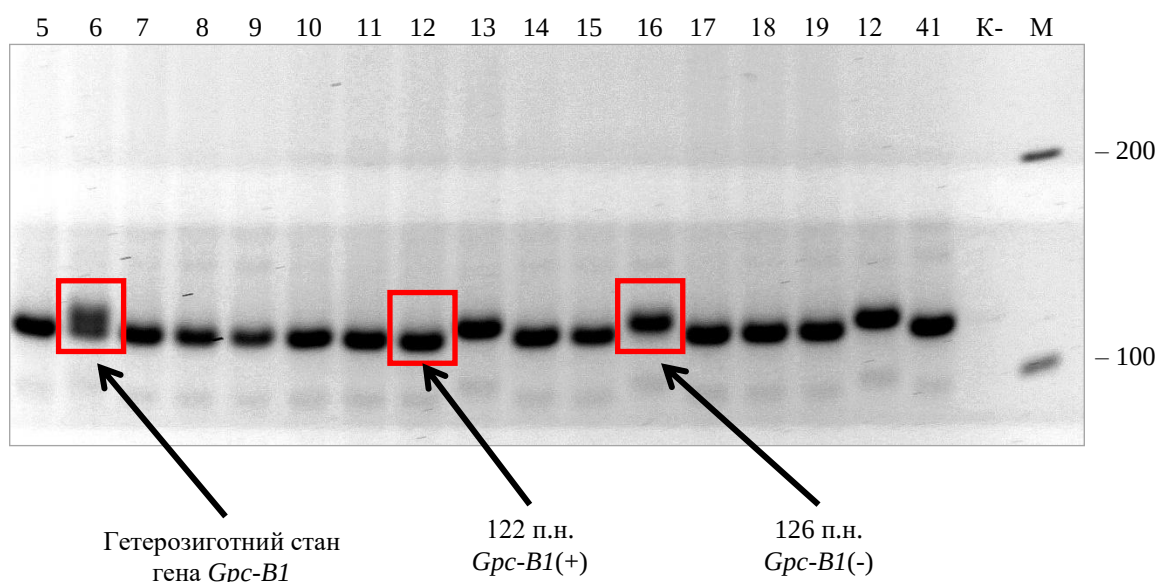


Рис. 7.20. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до гена *Gpc-B1*. Доріжки 5–19 – дослідні зразки відповідно номерів; 12 вкінці – сорт ‘Куяльник’, негативний контроль; 41 – лінія-донор із заміщеною 6В хромосомою, позитивний контроль; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Важливим етапом при отриманні бажаної чистої рекомбінантної лінії є контроль цільового гена в кожному поколінні, а також його стан гомо- чи гетерозиготний. Покоління F_5 було перевірене на наявність гена *Gpc-B1*. ДНК виділялась із суміші зернівок, що дало нам можливість відслідковувати гомозиготність лінії. З перевірених зразків більшість були гомозиготні і позитивні за геном *Gpc-B1*. Типова електрофореграма наведена на рис. 7.20.

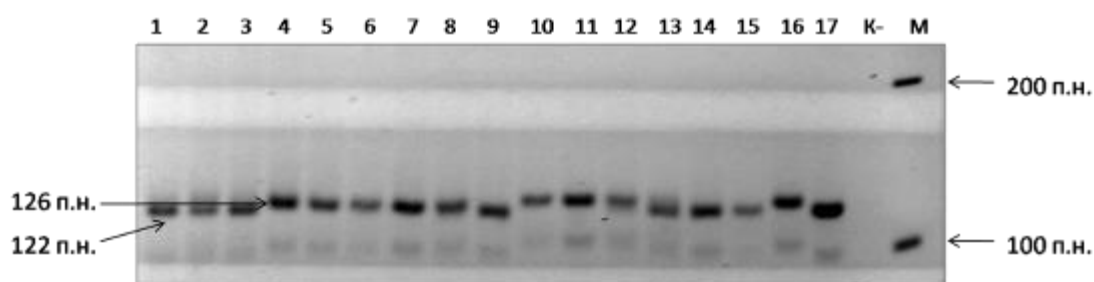


Рис. 7.21. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до гена *Gpc-B1*. Доріжки 1–15 – гібридні сім'ї; 16 – сорт 'Куяльник'; 17 – донор гена *Gpc-B1* лінія Glupro; K- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Таблиця 7.7

Результати перевірки гібридних ліній F_6 на наявність гена *Gpc-B1*

Номер лінії	Наявність <i>Gpc-B1</i>	Номер лінії	Наявність <i>Gpc-B1</i>
11910-1	+	11918-5	+
11913-1	+	11918-6	+
11913-2	+	11918-7	-
11913-3	+	11921-1	-
11913-4	+	11921-2	-
11913-5	+	11924-1	-
11913-6	-	11927-1	+
11913-7	+	11927-2	+
11916-1	+	11927-3	+
11916-2	+	11927-4	-
11916-3	+	11927-5	-
11916-4	+	11939-1	+
11916-5	+	11939-2	+
11918-1	-	11939-3	+
11918-2	-	11939-4	+
11918-3	-	11939-5	+
11918-4	+		

Примітки: «+» вказує на присутність локусу *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* у гомозиготному стані; «-» вказує на відсутність локусу *Gpc-B1* *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Покоління F_6 також було перевірене на наявність гена *Grc-B1* (табл. 7.7). ДНК виділялося із суміші зернівок, що дало нам можливість відслідковувати чистоту лінії в цілому. З перевірених зразків більшість були гомозиготними і позитивними за геном *Grc-B1*. Типова електрофореграма наведена на рис. 7.21.

7.2.2. Аналіз мінерального і білкового складу гібридних сімей F_5 – носіїв гена *Grc-B1*

Аналіз гібридних сімей F_5 покоління був проведений методом ICP-MS детектування. Для досліджень брали зерна у молочній фазі стиглості. Контролем виступав материнський сорт ‘Куяльник’. Завданням дослідження було визначити ступінь накопичення мікро- та мезоелементів у гібридних сім'ях-носіях гена *Grc-B1* на початковій фазі дозрівання зерна. Отримані дані наведені у табл. 7.8.

Вміст цинку в гібридних сім'ях в середньому становив 27,6 мг/кг сухої речовини, що на 28 % більше ніж у вихідного сорту. Максимальний вміст спостерігається у сім'ї № 98.3 – 33 мг/кг. Середній вміст заліза у зразках становив 28,7 мг/кг сухої речовини, тоді як у зернівках контролю – 27,0 мг/кг (різниця 8 %). Максимальний вміст заліза спостерігався у сім'ї № 51.5 – 32,0 мг/кг, мінімальний вміст у № 104.5 – 27,0 мг/кг. Невелику різницю можна пояснити тим, що зерна ще не були дозрілі й накопичення заліза в рослині ще тривало до повного дозрівання зерна. Середня концентрація мангану серед дослідних зразків, складала 64,6 мг/кг, що на 31 % більше ніж у вихідного сорту ‘Куяльник’. Максимальний вміст мангану відмічали у сім'ї № 125.5 – 77 мг/кг, тоді як мінімальний вміст у сім'ї № 94.4 – 59 мг/кг сухої речовини.

Таблиця 7.8

Вміст мікро- та мезоелементів у зернівках пшениці на початкових стадіях дозрівання (мг/кг сухої речовини)

Варіант, лінія	Мікроелементи					Мезоелементи
	Zn	Fe	Mn	Cu	Se	Mg
Контроль (Куяльник)	21a	27a	49a	4,2a	0,09a	1665a
18.2	24б	29a	63в	5,0б	0,41в	1682a
51.5	27в	32в	60б	5,0б	0,23б	1631a
94.4	26в	28a	59б	5,2б	0,03a	1681a
98.3	33г	29б	63в	6,0в	0,14a	1853б
104.5	24a	27a	65в	5,8в	0,11a	1648a
125.5	31г	30в	77г	7,2г	0,26б	1960в

Проаналізувавши показники вмісту Zn, Mn, Fe у зернівках F₅ покоління можна зробити висновки, що ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* суттєво підвищує накопичення даних мікроелементів у дослідних зразках. Цей ефект спостерігається навіть на початкових стадіях дозрівання зерна.

До того ж, нами було визначено вміст Cu і Mg в гібридних сім'ях. Середні значення вмісту міді у гібридних сім'ях перевищували на 35 % вміст у вихідного сорту, тоді як кількість магнію перевищувала на 5 %. Підвищений вміст елементів на такій ранній стадії свідчить про те, що ген *Gpc-B1* багатофункціональний і сприяє збільшенню вмісту не лише Fe, Mn, Zn, а й Cu і Mg.

Одним із важливих мікроелементів для пшениці є селен. Він являється складовим компонентом у понад 30-ти життєво важливих біологічно активних сполук організму людини, і входить в активні центри ферментів системи антиоксидантного захисту організму, метаболізму нуклеїнових кислот, ліпідів, гормонів. Серед продуктів рослинного походження головним джерелом селену в Україні є пшеничне борошно. Отже, контроль вмісту селену є надзвичайно важливим (Rayman, 2012). Середній вміст селену в дослідних сім'ях складав 0,207 мг/кг сухої речовини, що на 117 % більше, ніж у материнського сорту. Максимальний вміст селену спостерігається у сім'ї № 18.2 – 0,41 мг/кг сухої речовини, що у 4,5 разів більше контролю.

Визначення вмісту білка проводилося методом К'ельдаля (Kjeldahl, 1883). Встановлено, що з 44 ліній: 12 мали загальний вміст білка вище 14 %; 30 ліній – вище 12,5 %; 2 лінії – вище 12 %. Максимально високий вміст білка виявлено у лінії № 10 – 16,18 %, а мінімальний – у лінії № 17 – 12,14 %. В середньому, спостерігався приріст на 14 % відносно материнського сорту ‘Куяльник’. При цьому вміст білка у зерні сорту ‘Куяльник’ становив 11,85 %, а у батьківської лінії-донора Glupro – 15,84 %. Хоча лінія Glupro і характеризується високим вмістом білка, проте на противагу сорту ‘Куяльник’ не вирізняється за екстер'єром. Вона є маловрожайною і низькорослою у кліматичному поясі України, тобто не є перспективною для промислового вирощування. Підсумковий графік визначення білка у лініях у порівнянні з батьківськими культурами наведено на рис. 7.21.

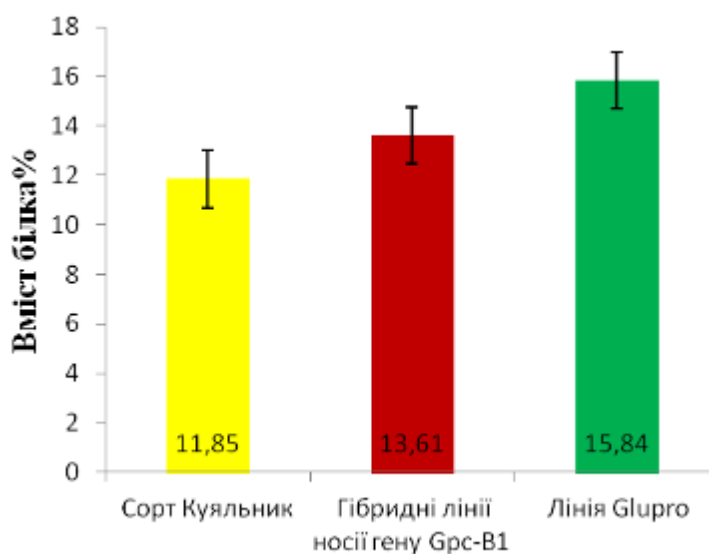


Рис. 7.21. Визначення вмісту білка у зрні методом К'ельдаля (Kjeldahl, 1883)

Згідно ДСТУ 4117:2007 існує сучасна експрес-методика вимірювання якісних показників зерна, одним із яких є визначення масової частки білка, заснована на інфрачервоній спектроскопії (NIR) (“ДСТУ 4117:2007 Зерно та продукти його переробки. Визначення показників якості методом інфрачервоної спектроскопії” 2007). Дана методика є менш точна у

порівнянні з методом К'ельдаля, але має ряд переваг, таких як швидкість проведення, простота, відсутність реактивів і малі витрати трудових ресурсів.

Серед проаналізованих 16-ти дослідних ліній, масова частка білка була в діапазоні від 14,23 % до 16,81 %, тоді як у сорту 'Куяльник' вміст білка становив 13,49 %. У лінії Glupro масова частка білка становила 16,9 %. Найбільший вміст білка серед гібридних сімей спостерігався у сім'ї № 7 і склав 16,81 %. Найменший вміст білка спостерігався у сім'ї № 21 і дорівнював 14,23 %, що в будь-якому випадку достовірно більше, ніж у вихідного материнського сорту. В середньому, серед гібридних ліній спостерігається приріст білка на 14 % більше у порівнянні з вихідним сортом 'Куяльник'. Графік порівняння вмісту білка у гібридних лініях і вихідних культурах наведено на рис. 7.22. Отримані дані аналізу двома методами співпадають і чітко вказують на те, що гібридні лінії-носії гена *Grc-B1* мають підвищений вміст загального білка у зерні, в середньому на 14 %. Підсумкова результати по двох методах аналізу зведено у табл. 7.9.

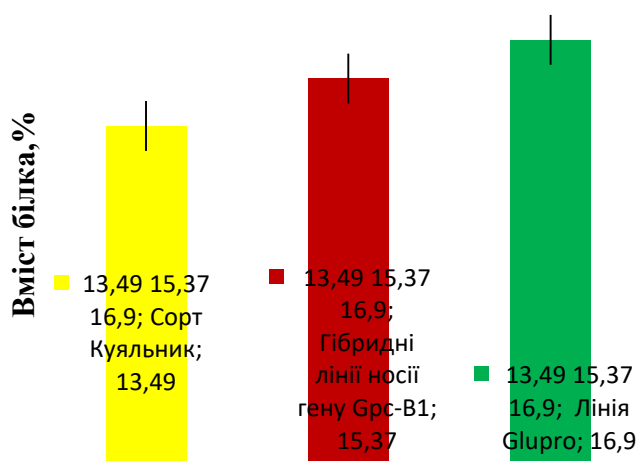


Рис. 7.22. Визначення вмісту білка у зерні гібридних ліній з геном *Grc-B1* методом NIR

Таблиця 7.9

Вміст білка, визначений методами К'єльдаля і NIR

Номер сім'ї	Визначення білка методом К'єльдаля, %	Визначення білка методом NIR, %
1	13,97	-
2	13,68	15,89
5	12,83	-
7	13,40	16,81
8	12,31	-
9	13,85	15,64
10	16,18	-
11	14,76	-
12	15,11	-
14	13,45	-
15	12,94	-
17	12,14	-
18	12,94	-
19	13,85	14,70
20	13,00	-
21	12,88	14,23
30	13,45	-
35	15,05	-
36	14,82	-
38	12,54	14,56
39	13,68	15,24
40	14,48	15,36
41	13,00	15,14
42	14,25	15,49
44	14,93	15,93
45	14,59	-
46	13,57	-
49	13,11	-
50	13,57	-
51	13,11	-
56	12,71	-
58	14,25	-
60	14,82	-
62	13,62	-
64	13,91	15,67
66	13,51	15,66
67	13,11	-
68	12,77	-
75	13,74	15,32
76	14,31	-
80	13,05	14,86
81	13,40	-
84	13,11	-
86	12,71	15,45
Сорт Куяльник	11,85	13,49
Лінія Glupro	15,84	16,90

Примітка: «-» – зразки не аналізувалися за даним показником.

Комплексний аналіз гібридних ліній м'якої озимої пшениці – носіїв гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* методом К'ельдаля та NIR є надзвичайно важливим для подальших селекційних робіт. Хоча в результатах вимірів між значеннями з різних методик були розбіжності, при обробці даних, отриманих двома методами, чітко видно, що в середньому вміст білка в гібридних лініях підвищується на 14 % у порівнянні з вихідним сортом 'Куяльник'. Особливу увагу потрібно звернути на лінії № 10, № 12 і № 35, у яких загальний вміст білка перевищує 15 % за методом К'ельдаля. Отримані результати свідчать про те, що перенесений ген *Gpc-B1* з дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoide* в нове генетичне оточення високопродуктивного сорту Куяльник функціонує, позитивно впливаючи на накопичення загального білка в зернівках культурної пшениці. Гібридні лінії, що досліджувалися є цінним генетичним матеріалом для подальших селекційних робіт і виведення нових високобілкових високоякісних сортів вітчизняної пшениці м'якої озимої.

Таким чином, розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах пшениці м'якої озимої та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі й обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для *Xgwm508* = $2,94 \pm 1,28$ %, *Xgwm193* = $3,96 \pm 1,51$ %, *Xgwm626* = $2,98 \pm 1,29$ %, *Xgwm219* = $6,77 \pm 2,08$ %.

Аналіз рослин F₄ і F₅ поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS, встановив, що присутність гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* зумовлює статистично (на рівні 0,05) значуще підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію. Комплексний аналіз вимірювання вмісту загального білка зернівок у рослин F₅ покоління методом К'ельдаля та NIR показав, що ген *Gpc-B1* обумовлює підвищення його вмісту на 14 % у порівнянні з вихідним сортом 'Куяльник'.

7.3. Вивчення алельних варіантів локусів запасних білків пшениці

7.3.1. Розробка підходів до детектування трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1*

Удосконалення та розробка надійних методів трансформації послідовностей ДНК у геном пшениці створили передумови для успішного маніпулювання генами, які кодують біосинтез клейковинних білків (Vasil et al., 1992; Weekset al., 1993; Becker et al., 1994). Для перенесення генів використовується, головним чином, метод бомбардування мікрочастками ембріогенних, здатних до регенерації тканин (Blechl, Anderson 1996; Masci et al., 2003). Найбільш придатними для перших дослідів із трансформації були обрані гени, що кодують високомолекулярні субодиниці глютенінів. Ці білки відіграють ключову роль у визначенні якості клейковини пшениці (Рибалка, 2011; Li et al., 2015; Metakovsky et al., 2018). На сьогодні отримані генотипи трансгенної пшениці, які є носіями додаткових генів, що кодують високомолекулярні глютеніни (Blechl et al., 1998; Barro et al., 2003).

Білки глютеніни кодуються *Glu-1* локусами, які локалізовані на довгих плечах хромосом 1A, 1B і 1D. Ці локуси позначаються *Glu-A1*, *Glu-B1* і *Glu-D1* відповідно. Кожен локус складається з двох щільно зчеплених частин – х- і у-типів (Wang et al., 2018). Для розділення білкових субодиниць ВМГ на основі їх рухливості використовують метод електрофорезу білків в поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфата натрія (ДСН ПААГ). Необхідно відмітити, що у-ген на хромосомі 1A є неактивним у більшості сортів пшениці (Злацька, 2010; Margiotta et al., 1996; Shewry et al., 1992; Payne, 1987).

Мінімальний поліморфізм виявляється у локусу *Glu-A1* і максимальний у локусу *Glu-B1*. Локус *Glu-D1* займає проміжне положення. Показано, що послідовність генів, які кодують Ах субодиниці (геном А) високомолекулярних глютенінів, схожі з послідовностями гомологічних

генів D-геному, в той час як послідовності Вх (В-геном) досить відрізняються від А і D (Shewry et al., 1992; Branlard et al., 2001).

Встановлено, що алелі *a* і *b* (синтез субодиниць 1 та 2* відповідно) локусу *Glu-A1* помітно впливають на властивості білка. Виявлено, що вміст клейковини та поглинання води борошном збільшуються у генотипів з алелем *b*, при цьому зменшується час формування тіста (Payne, Lawrence, 1983; Починок, Радченко, 2011).

Для визначення алельних варіантів локусу *Glu-A1* було розроблено ряд маркерів, які дозволяють виявляти алелі *a* і *b* (Ma et al., 2003; Liu et al., 2008). Проте кількість методів для визначення трансгенних копій гена *Glu-A1* наразі обмежена.

Для визначення екстра копій гена *Glu-A1* нами було змодельовано дві пари праймерів (табл. 7.10). Тут використовувалися дані про послідовність гена *Glu-A1*, яка була отримана з National Center for Biotechnology Information.

Таблиця 7.10

Характеристика змодельованих праймерів

Назва праймера	Нуклеотидна послідовність	Очікуваний розмір фрагмента	Опис
GluAF1	5'-AACTACAGTGTGAGCGCGAG-3'	207 п.н.	Праймери до першого екзона
GluAR1	5'-TCTGTTGGAGTTGCTGTGGT-3'		
GluAF2	5'-GAGACGTTAGCCCCGAGTG-3'	870 п.н.	Праймери до 1 і 2 екзонів
GluAR2	5'-CTAATTGCTGCTCTTGTGTTGA-3'		

Ефективність роботи даних праймерів було перевірено на зразках трансгенної та нетрансгенної пшениці методом ПЛР. Типові електрофореграми наведені на рис. 7.23–7.24. Обидві пари праймерів дозволили отримати очікувані амплікони розмірами 207 п.н. і 870 п.н., відповідно. Проте для праймерів GluAF2 / GluAR2 передбачали можливість ампліфікації фрагмента ДНК меншого розміру (орієнтовно 350 п.н.) у трансгенної пшениці, яка несе лише екзонні кДНК послідовності гена *Glu-A1*.

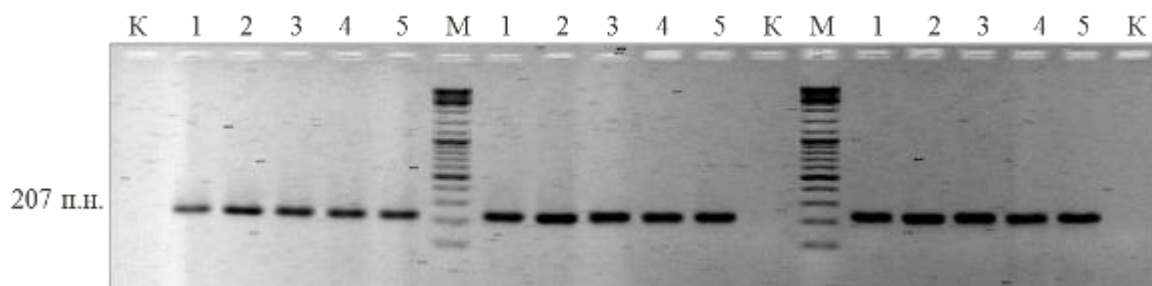


Рис. 7.23. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами GluAF1/GluAR1 до гена *Glu-A1* за різних температур ренатурації праймерів. Доріжки 1–5 – зразки пшениці; М – маркер молекулярної маси; К – негативний контроль, без ДНК.

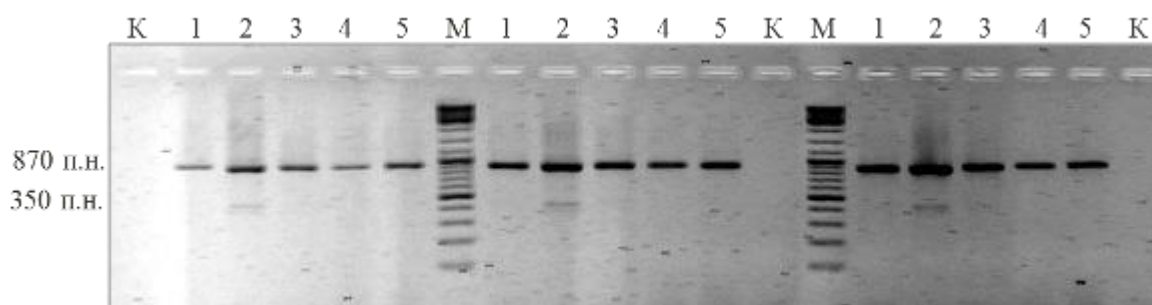


Рис. 7.24. Електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами GluAF2/GluAR2 до гена *Glu-A1* за різних температур гібридизації. Доріжки 1–5 – зразки пшениці; М – маркер молекулярної маси; К – негативний контроль без ДНК.

На доріжці № 2 (рис. 7.24) ми спостерігаємо амплікон розміром орієнтовно 350 п.н. одночасно з ампліконом 870 п.н. Це свідчить про ефективність системи, але для підтвердження цих даних необхідно додаткове дослідження з використання більшої кількості зразків. Отже, праймери GluAF1 / GluAR1 можна рекомендувати для використання у ПЛР в режимі реального часу для виявлення кількості трансгенних копій.

7.3.2. Аналіз алельного складу генів *Glu-1* системою молекулярно-генетичних маркерів у сім'ях-носіях гена *Gpc-B1*

Важливу роль у визначенні високої хлібопекарської якості борошна пшениці відіграють клейковинні білки глютеніни і гліadini, які загалом складають близько 80–85 % від загального вмісту білка в зерні (Yasmeen et al., 2015). З них найбільш цінними є глютеніни, які здатні до полімеризації шляхом утворення інтермолекулярних -S-S- зв'язків. Ці білки, головним

чином, формують макромолекулярний каркас клейковини і відповідають за такі важливі властивості тіста, як його еластичність та пружність (Атабаева, Массино, 2005; Рибалка, 2011). Субодиниці високомолекулярних глютенінів здебільшого мають молекулярну масу 65–90 кДа і кодуються тісно зчепленими *x* та *y* типами генів у локусах *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*, що розміщені на довгих плечах хромосом 1A, 1B, 1D (Payne et al., 1980).

Найсильніший вплив на якість борошна пшениці мають алелі локусу *Glu-D1*, за ним йдуть локуси *Glu-B1* та *Glu-A1* (Payne, 1987). За шкалою якості борошна пшениці, запропонованою Пейн і співавторами, найбільший індекс якості по *Glu-D1* має алельний варіант (5+10), по *Glu-B1* – (7+8; 17+18; 13+16), по *Glu-A1* – (2*; 1) (Payne et al., 1981). Перспективним для вивчення впливу високомолекулярних глютенінів на хлібопекарську якість є алель *Glu-B1a1*, продуктом експресії якого є дві субодиниці Vx7^{OE} та Vy8*. Алель, що кодує першу з них, має підвищений рівень експресії порівняно з алелем субодиниці Vx7 (Рибалка, Литвиненко, 2009).

Визначення алельного складу генів *Glu-1*, проводили в гібридних сім'ях покоління F₅, які є носіями гена *Gpc-B1* від дикої полби *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. Сорт 'Куяльник', як материнська форма має екстра сильні показники борошна, і несе найсильніші алелі *Glu-D1d* (білкові субодиниці 5 та 10), *Glu-B1a1* (білкові субодиниці 7 (екстраекспресія) та 8), *Glu-A1b* (білкова субодиниця 2*), тоді як батьківська лінія-донор немає таких сильних алелів.

Найціннішим алелем для якості борошна вважається *Glu-D1d*. Типова електрофореграма дуплексної ПЛР представлена на рис. 7.25. Даною системою молекулярно-генетичних маркерів було перевірено 44 гібридні сім'ї. Довжина очікуваних ампліконів становила: *Glu-D1*(5) – 281 п.н., *Glu-D1*(2) – 299 п.н., *Glu-D1*(10) – 397 п.н., *Glu-D1*(12) – 415 п.н. Обоє батьків несли алель *Glu-D1d*, поліморфізму у гібридних сімей не виявлено. Всі вони мали алельний склад гена *Glu-D1d*.

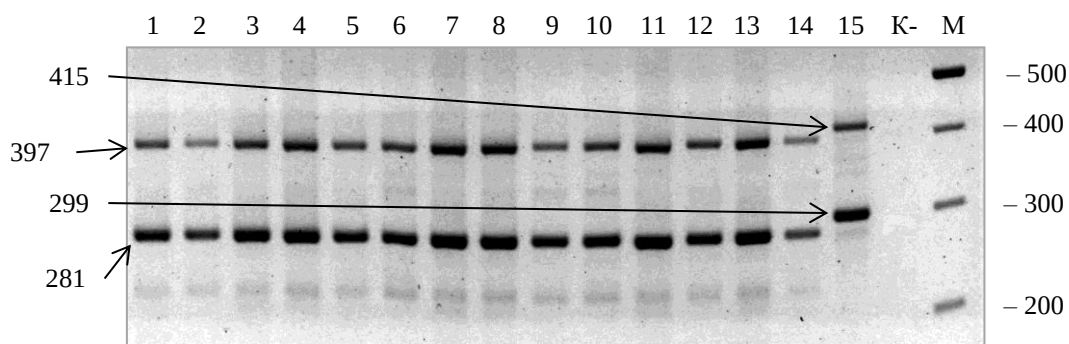


Рис. 7.25. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок гена *Glu-D1*. Доріжки 1–12 – гібридні сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17; 13 – сорт 'Куяльник', носій *Glu-D1d*; 14 – донор, лінія Glupro; 15 – сорт 'Золотоколоса', контроль на алель *Glu-D1a*; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Розміри ампліконів вказано у п.н.

Наступним етапом роботи був аналіз ділянки гена *Glu-A1*. Материнський сорт пшениці 'Куяльник' несе алель *Glu-A1b*, який кодує субодиницю 2*, тоді як батьківська донорна лінія несе алель *Glu-A1a* (субодиниця 1), що показано в попередніх дослідженнях білкових фракцій у поліакриламідному гелі (Похилько та ін., 2016). Типова електрофореграма дуплексної ПЛР представлена на рис. 7.26.

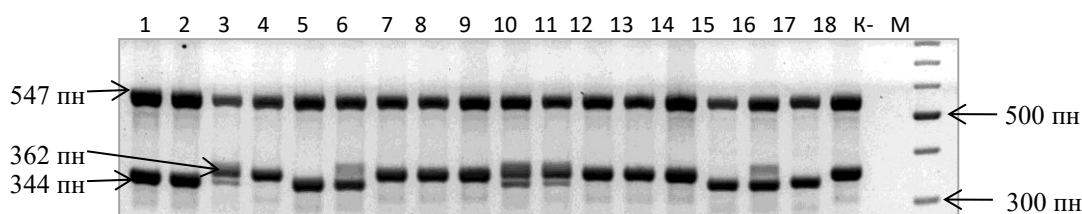


Рис. 7.26. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянок генів *Glu-A1* та *actin*. Доріжки 1–16 – гібридні сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21; 17 – сорт 'Куяльник', носій *Glu-A1b*; 18 – донор, лінія Glupro; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Довжина очікуваних ампліконів: для реферетного гена *actin* – 547 п.н., у разі наявності субодиниці *Glu-A1b* – 344 п.н., відсутності – 362 п.н. Серед перевірених 44 сімей було виявлено, що 11 з них несуть алель *Glu-A1b*, 22 – *Glu-A1a*, а 11 – гетерозиготні. Субодиниці 1 та 2* однаково добре впливають на якість борошна, тому представляють цінність стабільні гомозиготні сім'ї з будь-яким з цих алелів.

Гібридні сім'ї також аналізували на наявність субодиниці *Glu-B1a1*, яка присутня лише у материнського сорту 'Куяльник', тоді як батьківська лінія Glupro несе *Glu-B1d*, який кодує синтез субодиниць 6 та 8. Типова електрофореграма мультиплексної ПЛР наведена на рис. 7.27.

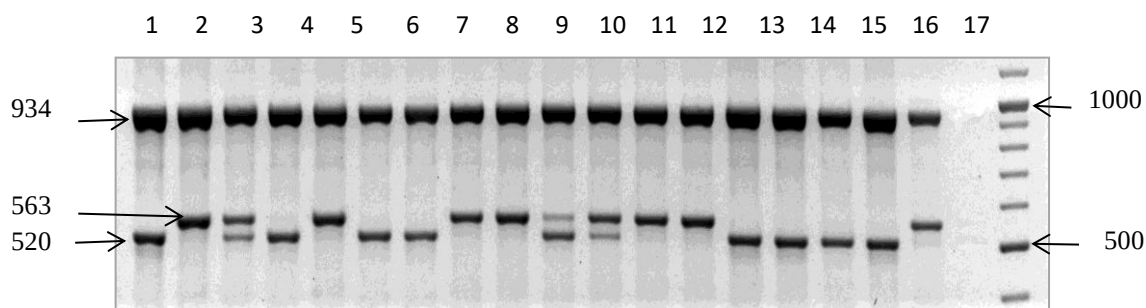


Рис. 7.27. Електрофореграма продуктів ампліфікації регіону MAR гена *Glu-B1a1* та референту *TaTM20*. Доріжки 1–16 – гібридні сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21; 17 – лінія Glupro; 18 – сорт 'Куяльник', містить *Glu-B1a1*; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Довжина очікуваних ампліконів: для референтного гена *TaTM20* склала 934 п.н., за наявності *Glu-B1a1* – 563 п.н., відсутності – 520 п.н. Серед перевірених 44 гібридних сімей (табл. 7.11) було виявлено 21-у сім'ю, що несе *Glu-B1a1*, 16-ть сімей, що несуть *Glu-B1d* і 7-м гетерозиготних сімей. Цінними є сім'ї, що несуть алель *Glu-B1a1*, тому що наявність *Glu-B1d* значно знижує якість борошна.

Отже, проведено оцінку 44 гібридних сімей F_5 покоління, носіїв гена *Gpc-B1*, на наявність алельних субодиниць генів *Glu-1* запасних білків. По трьом локусам *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16 найбільш цінних сімей – 2, 8, 11, 12, 17, 18, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 58, 64, 68, 86. Вони містять оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення.

Таблиця 7.11

Алельний склад локусу *Glu-1* у гібридних сім'ях пшениці

№ сім'ї	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
1	b	d	d
2	b	al	d
5	b/a	al/d	d
7	a	d	d
8	b	al	d
9	b/a	d	d
10	a	d	d
11	a	al	d
12	a	al	d
14	b/a	al/d	d
15	b/a	al/d	d
17	a	al	d
18	a	al	d
19	a	d	d
20	b	d	d
21	b/a	d	d
30	a	d	d
35	a	al	d
36	b	al	d
38	a	al	d
39	a	al	d
40	a	al	d
41	a	al	d
42	b/a	al/d	d
44	b/a	al	d
45	b/a	al/d	d
46	b/a	al	d
49	b/a	al	d
50	a	al/d	d
51	a	d	d
56	a	d	d
58	b	al	d
60	b	d	d
62	a	al/d	d
64	a	al	d
66	a	d	d
67	b	d	d
68	a	al	d
75	b/a	al	d
76	b/a	al	d
80	b	d	d
81	b	d	d
84	b	d	d
86	a	al	d
Куяльник	b	al	d
Glupro	a	d	d

Примітка: Куяльний – сорт ‘Куяльник’, материнська форма; Glupro – батьківська лінія-донор гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, перенесеного у рамках цілої заміщеної 6В хромосоми.

7.4. Визначення алельного поліморфізму генів, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці

7.4.1. Виявлення алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці

Одним із важливих критеріїв технологічних властивостей зерна пшениці м'якої є дисперсність борошна, що обумовлена структурою ендосперму зернівки, його твердістю (Grausgruber et al., 2000). Твердозерні форми при загальноприйнятих режимах помелу дають крупчасте, розсипчасте борошно, а з м'якозерних форм при тих же режимах помелу утворюється дрібне, пилоподібне борошно. Твердозерним сортам надаються переваги перед м'якозерними при хлібопеченні. У м'якозерних пшениць встановлена тісна кореляція між дисперсністю борошна та його хлібопекарською характеристикою (Ярош та ін., 2014). Кондитерські вироби з борошна спеціальних м'якозерних зразків пшениці мають низку переваг за якістю у порівнянні з випічками, отриманими на основі борошна звичайної хлібопекарської пшениці. Вищу якість бісквітів зумовлюють декілька основних фізико-хімічних властивостей: більш низька водопоглинальна здатність борошна, тонкокрупчаста структура, характерна природна розпушеність та низький відсоток ушкоджених крохмальних гранул. Бісквіти відрізняються від хліба, передусім, високим вмістом цукру, що становить майже третину загальної маси тіста. Звідси і особливі вимоги до кондитерського борошна. Воно має бути якомога менш гідрофільним, тобто поглинати небагато води, яку додають до тіста. Оскільки помел м'яких пшениць вбирає обмаль води, більша її частина йде на розчинення цукру, що поліпшує дифузію сиропу в тісті. Такий заміс здатний деякий час залишатися рідким за високих температур випікання, що забезпечує потрібне розширення його під дією розпушувачів, а отже, й значно підвищує якість кінцевого продукту.

Текстура ендосперму пшениці контролюється кількома генами, які локалізовані на короткому плечі хромосоми 5D, у так званому *Ha* (*Hardness*) локусі. На ньому розміщені гени, які кодують три поліпептиди, які складають білок фріабілін: пуроіндоліни *a* (ген *Pina-D1*) та *b* (ген *Pinb-D1*), а також Grain Softness Protein (*Gsp-1*). Пуроіндоліни, як поверхнево активні білки, взаємодіючи з ліпідами мембран крохмальних зерен оберігають їх від руйнування при помолі. Дикий тип м'яких пшениць має м'яку структуру ендосперму, що пов'язано з наявністю алелів *Pina-D1a* та *Pinb-D1a*. У твердозерних пшеницях один з генів чи обидва, або ж продукти цих генів, неактивні через нефункціональні мутації (Рибалка, 2011).

Досліджуваным матеріалом для визначення алельного складу генів, що детермінують консистенцію ендосперму зернівки пшениці, виступали зразки листкових пластинок чи зернівок пшениці. В рамках дослідження було проведено градієнтні полімеразні ланцюгові реакції з метою підбору оптимальної температури ренатурації праймерів та виявлення різних алелів генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Електрофореграми наведені на рис. 7.28 та 7.29.

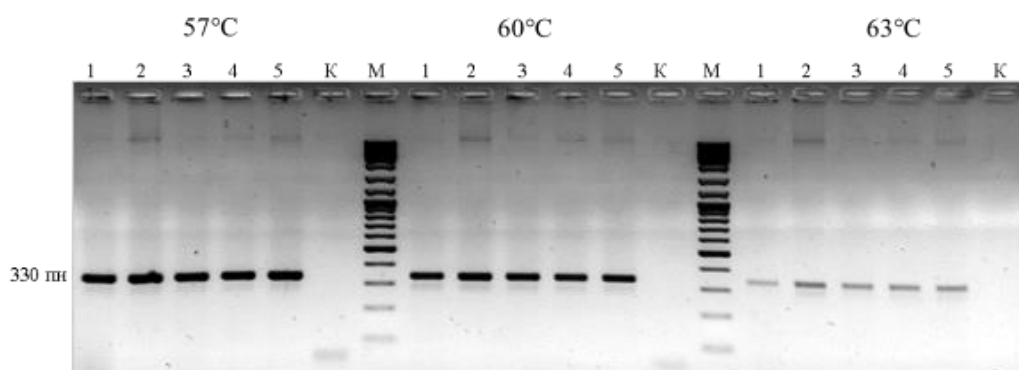


Рис. 7.28. Електрофореграма результатів градієнтної ПЛР гена *Pina-D1*. Доріжка 1–5 – дослідні зразки за різної температури ренатурації праймерів; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Оскільки продукти ампліфікації гена *Pinb-D1* несуттєво відрізняються за розміром, то для кращої візуалізації результатів було проведено рестрикцію продуктів ампліфікації за допомогою ендонуклеази *MbiI*. Після рестрикції на електрофореграмі дикий тип, який відповідає за м'якозерний

тип ендосперму, представлений ампліконом розміром 320 п.н., а нуль-алель, який визначає твердозерний тип ендосперму – ампліконом розміром 200 п.н.

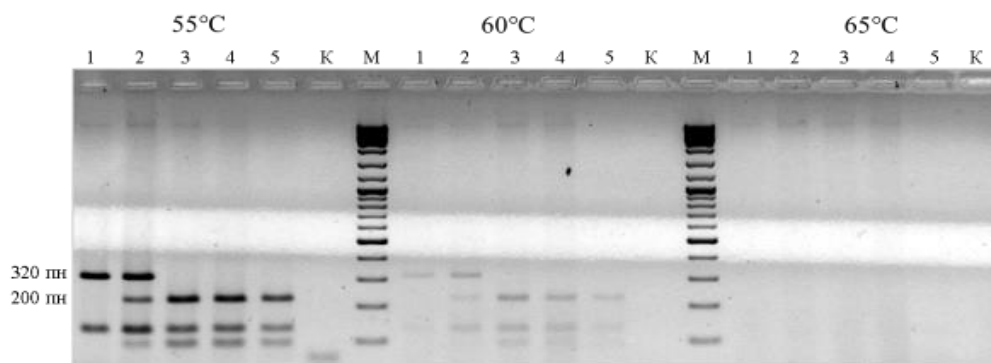


Рис. 7.29. Електрофореграма результатів градієнтної ПЛР гена *Pinb-D1*. Доріжка 1–5 – дослідні зразки за різної температури ренатурації праймерів; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Алельний склад гена *Pina-D1* було визначено для 162 сортів та гібридів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції, проте досліджена вибірка не виявила поліморфізму гена. Всі зразки були представлені алелем дикого типу *Pina-D1a*, який відповідає за м'яке зерно.

7.4.2. Дослідження алельного складу пуроіндолінових генів у сім'ях пшениці м'якої – носіях гена *Gpc-B1*

Текстура ендосперму – один з важливих факторів при селекції цінних форм рослин, що визначає галузь харчової промисловості, де будуть в подальшому використовуватися сорти пшениці. В даній роботі оцінку текстури ендосперму проводили за допомогою ПЛР-маркерів за алельним складом генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*. Типова електрофореграма ПЛР ампліфікації гена *Pina-D1* представлена на рис. 7.30.

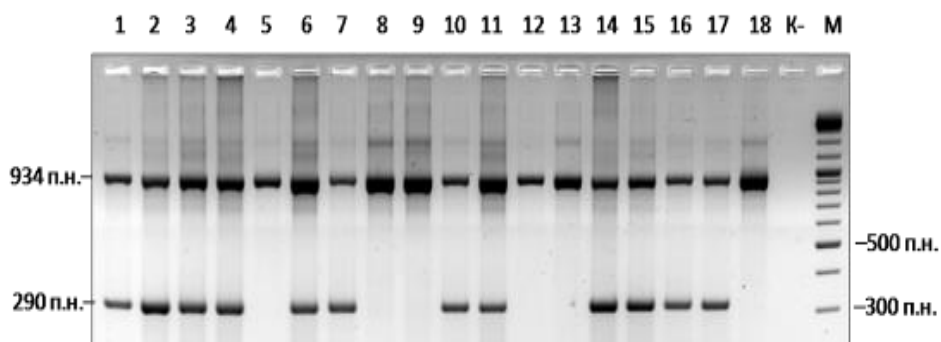


Рис. 7.30. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до гена *Pina-D1*. Доріжки 1–16 – сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, відповідно; 17 – сорт 'Куяльник'; 18 – донор *Gpc-B1* лінія Glupro; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Поява амплікону розміром 290 п.н. свідчить про наявність алелю *Pina-D1a*, успадкованого від материнського сорту 'Куяльник', тоді як відсутність даного амплікону вказує на наявність алелю *Pina-D1b*, як у батьківської лінії Glupro. Амплікон референтного гена *TaTM20* розміром 934 п.н. вказує на адекватний перебіг реакції. Аналіз зернівок показав, що серед 44 ліній 32 мали алель *Pina-D1a*, а 12 – *Pina-D1b*. Переважна більшість сортів української селекції несуть алель *Pina-D1a* (Чеботарь и др., 2012), тому привнесення нового алелю *Pina-D1b*, позитивно впливає на подальшу селекцію українських сортів.

Типова електрофореграма ПЛР з праймерами до гена *Pinb-D1* представлена на рис. 7.31.

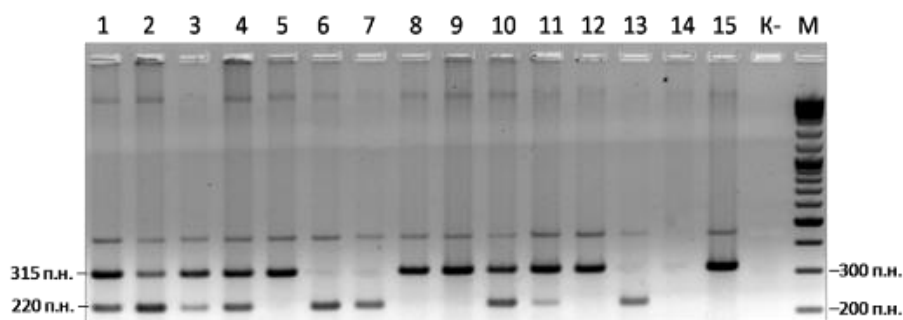


Рис. 7.31. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК зразків пшениці з праймерами до гена *Pinb-D1*. Доріжки 1–12 – сім'ї 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, відповідно; 13 – сорт 'Куяльник'; 14 – донор *Gpc-B1* сорт 'Langdon' тетраплоїдний; 15 – донор *Gpc-B1* лінія Glupro гексаплоїдна; К- – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Амплікони розміром 315 п.н., вказує на наявність алеля *Pinb-D1a*, тоді як амплікони розміром 220 пар нуклеотидів – на *Pinb-D1b*. З проаналізованих 44 ліній, 12 несли алель *Pinb-D1a*, 17 – *Pinb-D1b*, а 15 були гетерозиготними за даним геном.

Більшість ліній містять алелі *Pina-D1a* та *Pinb-D1b*, що характерно для сортів української селекції і материнського сорту ‘Куяльник’. Наявність алелів *Pina-D1b* та *Pinb-D1a* характерна для сортів пшениці США (Matus-Cádiz et al., 2008), звідки і походить заміщена лінія Glupro, носій гена *Gpc-B1* від *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, яка в нашому експерименті є вихідним батьківським компонентом (Khan et al., 2000; Distelfeld et al., 2006).

Фізичний показник твердозерності було перевірено у 16 дослідних ліній, у батьківської лінії Glupro та материнського сорту ‘Куяльник’. Дані наведені у таблиці 7.12.

Таблиця 7.12

Наявність алелів генів *Pina*, *Pinb* і значення показника твердозерності у дослідних ліній

№ лінії	Алель <i>Pina</i>	Алель <i>Pinb</i>	Твердозерність
2	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	11
7	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	10
9	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	17
19	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	7
21	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	-2
38	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	11
39	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	28
40	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	20
41	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	43
42	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a/Pinb-D1b</i>	14
44	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	9
64	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	26
66	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	31
75	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	7
80	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	30
86	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	34
Сорт ‘Куяльник’	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	16
Лінія Glupro	<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	15

Метод інфрачервоної спектрометрії показав, що всі гібридні сім'ї і батьківські форми, мають не більше 45 одиниць твердозерності, що відповідає групі м'язозерних сортів пшениці. В дослідженні були присутні всі варіації алелів пуроіндолінових генів. За даними дослідників, сорти, що несуть алелі *Pina-D1b*, *Pinb-D1a*, повинні мати більшу твердість ендосперму в порівнянні з сортами, що несуть алелі *Pina-D1a*, *Pinb-D1b* (Matus-Cádiz et al., 2008).

Статистична обробка даних вказує, що значення твердозерності для ліній, які мали алель *Pina-D1b* гена *Pina-D1*, була вищою ніж для ліній, які мали алель *Pina-D1a* ($p < 0,05$). В той же час різниця між медіанами по цьому параметру для різних комбінацій алелів гена *Pinb-D1* знаходилася в межах статистичної похибки. Крім того, лінії, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1b* *Pinb-D1a*, (медіана = 37) мали статистично достовірну вищу твердозерність ($p < 0,05$) ніж лінії, в яких було виявлено комбінацію алелів *Pina-D1a* *Pinb-D1b* (медіана = 14), що добре узгоджується з літературними даними, отриманими на північно-американських пшеницях (Matus-Cádiz et al., 2008).

Аналіз алельного складу пуроіндолінових генів виявив їх широке різноманіття серед отриманих ліній. З'ясовано, що комбінація алелів *Pina-D1b* *Pinb-D1a* є більш бажаною для підвищення твердозерності зерна, перевищуючи за своїм значенням навіть показники такого високоякісного стандарту як сорт 'Куяльник'.

7.4.3. Вплив різних алелів гена *Pinb-D1* на технологічні показники зерна і консистенцію ендосперму зернівки пшениці комерційних сортів

Розроблені нами системи були використані для аналізу вибірки сортів вітчизняної та зарубіжної селекції з метою оцінки впливу різних алелів гена *Pinb-D1* на технологічні показники зерна і консистенцію ендосперму зернівки.

Таблиця 7.13

**Сорти пшениці, досліджені за технологічними показниками зерна і
консистенцією ендосперму зернівки**

Сорт	Вологість, %	Твердозерність,о д.	Білок, %	Клейковина, %	<i>Pina- D1</i>	<i>Pinb- D1</i>
Тюбальт	13,2	49	12,4	26,0	a	a
Переяславка	12,3	47	11,7	24,4	a	b
Зимоярка (1)	11,7	39	11,3	23,6	a	a
Зимоярка (2)	11,6	48	11,5	24,0	a	a
Подолянка	12,4	37	13,0	27,5	a	b
Фаворитка	12,4	30	13,5	28,5	a	b
Новокиївська	12,5	51	14,4	30,5	a	b
Glenlea	11,9	76	15,3	32,7	a	a
Смуглянка (а)	11,7	66	13,4	28,3	a	b
Смуглянка (б)	11,8	75	13,8	29,2	a	b
Журавка	12,4	36	12,0	25,0	a	b
Зиск	12,5	37	11,7	24,3	a	b
Ліра	12,7	63	13,6	28,8	a	b
Місія	12,1	45	11,6	24,2	a	b
Нива Одеська	12,1	48	13,2	28,0	a	b
Українка	12,2	44	13,8	29,2	a	b
Корелі	11,7	65	13,4	28,4	a	a
Годувальниця	11,6	46	13,5	28,4	a	b
Наталка	11,9	45	13,7	28,9	a	b
Київська остиста	12,0	54	16,3	34,9	a	b
Крижинка	11,8	47	12,5	26,2	a	b
Богдана	11,5	31	12,9	27,3	a	b
Панна	11,6	60	14,2	30,1	a	b
Золотоколоса	11,1	61	11,9	24,8	a	b
Славна	11,6	62	12,4	25,9	a	b
Спасівка	11,6	74	14,5	30,8	a	b
Борія	11,5	63	13,0	27,3	a	b
Княгиня Ольга	11,9	62	13,0	27,5	a	b
Миронівська 65	10,8	45	12,4	26,0	a	b
Лідер	10,8	46	11,3	23,4	a	b
Куяльник	10,6	37	13,7	29,0	a	b
Поліська 90	11,6	48	14,2	30,1	a	a
Альбатрос	12,0	40	13,4	28,2	a	b
Херсонська б/о	11,7	51	11,9	24,9	a	b
Антонівка	12,6	49	11,9	25,0	a	b
Кірія	12,0	55	12,7	26,7	a	b
Гурт	11,9	44	13,9	29,5	a	b
Бунчук	11,7	40	13,8	29,2	a	b
Ватажок	11,7	38	12,9	27,2	a	b
Ужинок	11,3	53	12,0	25,2	a	b
Жайвір	11,4	63	12,7	26,7	a	b
Одеська 267	12,2	59	11,8	24,7	a	b
Соната	11,6	51	11,1	22,9	a	b
Гармонія	11,9	27	13,5	28,5	a	b
Досконала	11,7	36	13,9	29,4	a	b
Куяльник	10,5	27	14,0	29,6	a	b
Куяльник	10,5	32	13,8	29,3	a	b
Сотниця	11,0	69	14,0	29,7	a	b

Досліджуваним матеріалом виступали 156 зразків сортів пшениці серед яких 136 української та 20 зарубіжної селекції, 1 зразок *Aegilops cylindrica*, 2 зразки *Aegilops tauschii*, 2 пшеничних амфіплоїди та 3 зразки полби від різних оригінаторів, а також 33 цінних гібриди частково ваксі пшениці.

Серед досліджених зразків лише один мексиканський сорт пшениці Bobwhite виявив нуль-алель гена *Pina-D1*, решта ж несла алель дикого типу *Pina-D1a*, який визначає м'яку текстуру зерна. Для гена *Pinb-D1* алель дикого типу *a* має меншу частоту зустрічання і складає серед українських сортів 5,9 %, а серед зарубіжних 45 %; нуль-алель складає відповідно 93,1 % для українських сортів та 65 % для зарубіжних. Для виявлення потенційних донорів алеля *Pina-D1b*, який детермінує тверду текстуру ендосперму, був проведений додатковий моніторинг сортів зарубіжної селекції. Для відібраних зразків було проведено виміри значень твердозерності методом NIRS. Отримані результати наведені в табл. 7.13.

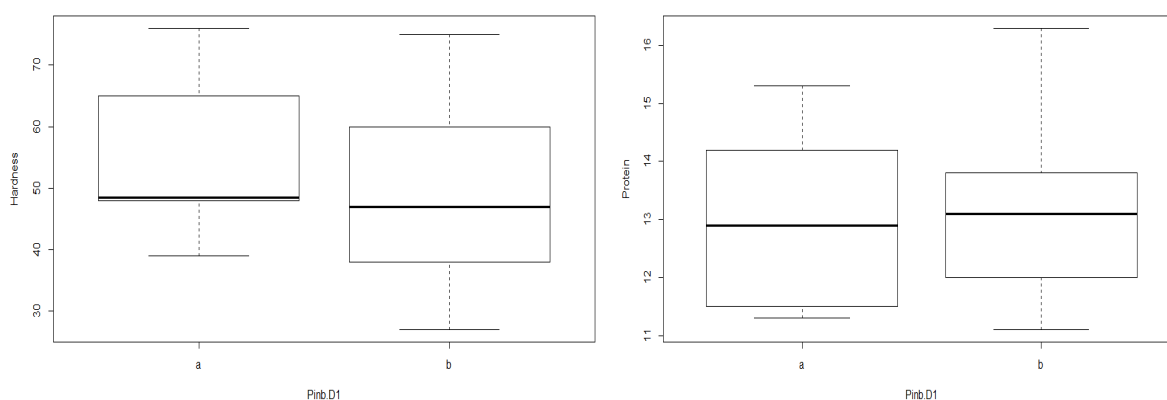


Рис. 7.32. Вплив наявності алелів *a* та *b* гена *Pinb-D1* на твердозерність комерційних сортів пшениці (ліворуч) та на вміст білка (праворуч). На діаграмі показано медіани, квартилі та інтерквартильні відстані.

Статистично достовірного впливу різних алелів гена *Pinb-D1* на твердозерність та кількість білка і клейковини не виявлено.

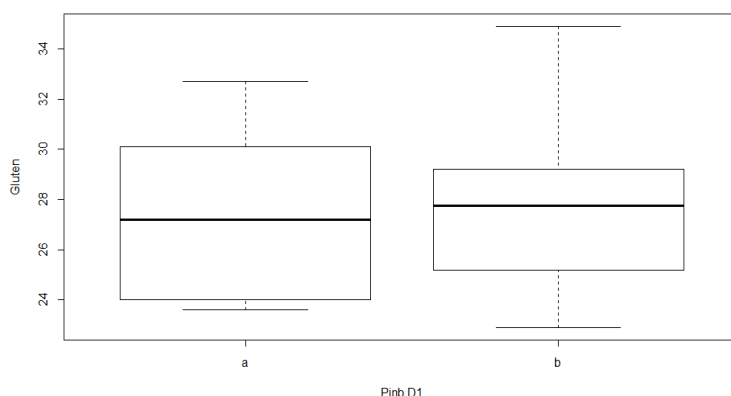


Рис. 7.33. Вплив наявності алелів гена *Pinb-D1* на вміст глютену в зерні комерційних сортів пшениці. На діаграмі показано медіани, кватили та інтерквартильні відстані.

Товстою лінією позначено медіану (медіана, а не середнє, бо не було нормального розподілу). Значення середніх теж майже не відрізнялися. Структура ендосперму зерна була також детектована для цінних гібридів частково ваксі пшениці. Дані наведені в табл. 7.14.

Таблиця 7.14

Гібриди частково ваксі пшениці, досліджені на показник твердозерності

Гібрид	Вологість, %	Твердозерність	Білок, %	Клейковина, %	Wx-A1	Wx-B1	Wx-D1	Pinb-D1
1 (12154)	8,9	24	13,59	28,7	a	a	b	b
2 (12155)	9,3	20	13,49	28,5	a/b	a	b	b
3 (12158)	8,7	37	13,66	28,9	a	a	b	b
4 (12159)	8,4	47	14,13	30	a	a	b	b
5 (12161)	8,9	29	14,13	30	a	a	b	b
6 (12167)	9,8	-12	14,26	30,3	a	b	a/b	a+/b
7 (12169)	9,5 (9,6)	-15 (-7)	13,52 (13,59)	28,6 (28,8)	a	b	a	a
8 (12175)	9,2	21	14,6	31,1	a/b	b	a/b+	b
9 (12180)	8,9	36	13,44	28,4	a	b	b	b
10 (12182)	9,1	19	12,78	26,9	a	b	b	b
11 (12183)	8,8	36	13,32	28,1	a	b	b	b
12 (12192)	9,7	-20	13,54	28,6	b	a+/b	a/b	a
13 (12199)	8,7	27	12,98	27,4	b	a	a	a
14 (12209)	9,6	-12	14,18	30,1	b	a	a	a
15 (12211)	8,6	50	13,41	28,3	b	a	a	b
16 (12212)	8,7	52	13,48	28,5	b	a	a	b
17 (12221)	-	-	-	-	a/b	a	b	a/b
18 (12225)	9,7	2	14,06	29,8	a/b	a	a/b	a/b
19 (12229)	8,8	35	14,20	30,2	b	a	b	b
20 (12231)	9,1	32	14,37	30,6	b	a	b	b

Гібрид	Вологість, %	Твердозерність	Білок, %	Клейковина, %	<i>Wx-A1</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>	<i>Pinb-D1</i>
21 (12236)	8,8	42	13,73	29,1	b	b	a	b
22 (12239)	9,2	32	13,39	28,3	b	b	a	b
23 (12240)	8,5	47	14,33	30,5	b	b	a	b
24 (12249)	9,5	-8	14,67	31,2	b	b	a	a
25 (12253)	10,0	-14	14,72	31,4	b	b	a	a
26 (12269)	9,0	20	16,05	34,4	a	a	a	b
27 (12272)	-	-	-	-	a	a	a	b
28 (12276)	-	-	-	-	a	a	a	b
29 (12284)	-	-	-	-	a	a	a	a
30 (12290)	-	-	-	-	a	a	a	b
31 (12294)	-	-	-	-	a	a	a	b
32 (12319)	9,0	20	14,48	30,8	a/b	a/b	a/b	b
33 (12321)	8,8	53	14,13	30,0	b	b	a	b
34 (634)	8,3	22	14,26	30,3	b	b	b	b
Куяльник 1	8,8	15	13,64	28,9	a	a	a	b
Куяльник 2	8,9	20	13,73	29,1	a	a	a	b

В результаті багатофакторного дисперсійного аналізу було показано, що наявність різних алелів гена *Pinb-D1* впливає на твердозерність ($p < 0,001$). Так, при наявності алеля *Pinb-D1b*, твердозерність виявилася значно ($p < 0,05$) вищою, ніж при наявності алелів *Pinb-D1a* та *Pinb-D1a/Pinb-D1b*. Впливу різних алелів інших генів на цей показник виявлено не було.

Вплив різних алелів генів *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та *Pinb-D1* на кількість білка та клейковини знаходився на рівні статистичної похибки. Дані обрахунки ілюструються діаграмами, представленими нижче (рис. 7.34).

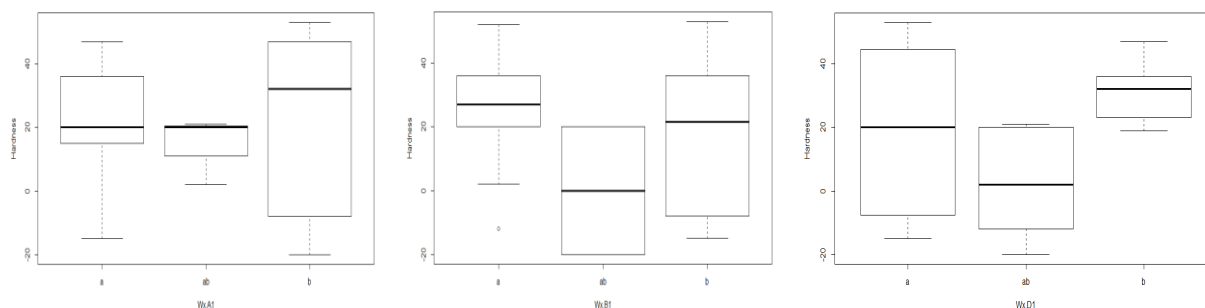


Рис. 7.34. Вплив алелів *a*, *ab* та *b* генів *Wx-A1* (ліворуч), *Wx-B1* (посередині) та *Wx-D1* (праворуч) на твердозерність селекційних гібридів пшениці. На діаграмі показано медіани, квартилі та інтерквартильні відстані.

У багатофакторному дисперсійному аналізі (рис. 7.35) впливу різних алелів генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на твердозерність селекційних гібридів пшениці було виявлено спільний вплив ($p < 0,01$) комбінацій алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*.

```
> aovMult = aov(Hardness ~ Pinb.D1*Wx.D1*Wx.B1*Wx.A1, data = LTable)
> summary(aovMult)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Pinb.D1	2	9613	4807	46.037	3.96e-07 ***
Wx.D1	2	686	343	3.284	0.06563 .
Wx.B1	2	32	16	0.152	0.86039
Wx.A1	2	748	374	3.584	0.05343 .
Pinb.D1:Wx.D1	1	57	57	0.546	0.47132
Pinb.D1:Wx.B1	2	319	160	1.529	0.24876
Wx.D1:Wx.B1	1	167	167	1.597	0.22568
Pinb.D1:Wx.A1	1	73	73	0.695	0.41748
Wx.D1:Wx.A1	1	995	995	9.529	0.00752 **
Wx.B1:Wx.A1	1	28	28	0.264	0.61461
Residuals	15	1566	104		

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Рис. 7.35. Результати багатофакторного дисперсійного аналізу впливу різних алелів генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на твердозерність селекційних гібридів пшениці.

Проте детальніший однофакторний дисперсійний аналіз саме цих комбінацій на тих же даних не дає можливості однозначно підтвердити такий вплив ($p < 0,1$) (рис. 7.36). Пояснити цю ситуацію можна недостатньою кількістю проаналізованих ліній для кожної комбінації алелів, що вимагає додаткових досліджень з виявлення таких комбінацій у нових генотипів.

```
> aovHardness = aov(Hardness ~ Wx.A1.WxD1, data = LTable)
> summary(aovHardness)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Wx.A1.WxD1	7	5452	778.8	2.028	0.0949 .
Residuals	23	8831	384.0		

```
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Рис. 7.36. Результати однофакторного дисперсійного аналізу впливу різних комбінацій алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1* на твердозерність пшениці.

На відміну від гібридів, де було показано сильний вплив ($p < 0,001$) на твердозерність наявності тих чи інших алелів гена *Pinb-D1*, у комерційних сортів української селекції такого впливу виявлено не було, що свідчить про те, що імовірно дія гена *Pinb-D1* залежить від генетичного оточення. Також

було показано, що комбінація алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1* можливо також впливає на твердозерність. Для контролю твердозерності сортів пшениці розроблено системи ДНК-маркерів для генів, які детермінують цю важливу ознаку.

7.5. Вивчення генів, які детермінують склад крохмалю в ендоспермі зернівок

Зернові культури зі зміненим складом крохмалю, володіючи важливими для виробництва унікальними характеристиками, є основою для створення сортів спеціального призначення, які б задовольняли зростаючі потреби виробників у різноманітній високоякісній сировині. Нами було відібрано та залучено у подальший селекційний процес гібриди м'якої пшениці, отримані від схрещування генетично модифікованої лінії MJ16-112 твердої пшениці (Sestili et al., 2010) із комерційними сортами пшениці м'якої озимої 'Куяльник' та 'Актор'.

У даному разі, розробка ефективних маркерних систем для ідентифікації бажаних генетичних факторів, які призводить до підвищення вмісту амілози у зерні пшениці, є надзвичайно важливою. Молекулярно-генетичний аналіз зразків пшениці з підвищеним вмістом амілози був направлений на відбір ліній, які несли б цільний локус із синтетичним геном *SBEIIa* та зберігали б D геном при проведенні селекційних схрещувань.

Для проведення успішного добору було попередньо розроблено та оптимізовано полімеразні ланцюгові реакції для визначення наявності синтетичного гена *SBEIIa* та селективного гена *bar*. Виявлення цільового гена розгалуження амілопектину *SBEIIa* проводили за використання пари праймерів, змодельованої на основі нуклеотидної послідовності гена у програмі CLC Main Workbench (QIAGEN) (*CLC Main Workbench* (version 6.9.2) 2013). Змодельована пара праймерів визначає три екзони гена *SBEIIa* як в даній лінії, так і природного гена в геномі пшениці. Тому, на

електрофореграмі у разі детекції рослини з донорним локусом будуть наявні два амплікони розміром 210 та 483 п.н., а в разі відсутності вставки – тільки один 483 п.н. оскільки між екзонами гена дикого типу наявні інтронні ділянки. Типова електрофореграма наведена на рис. 7.37.

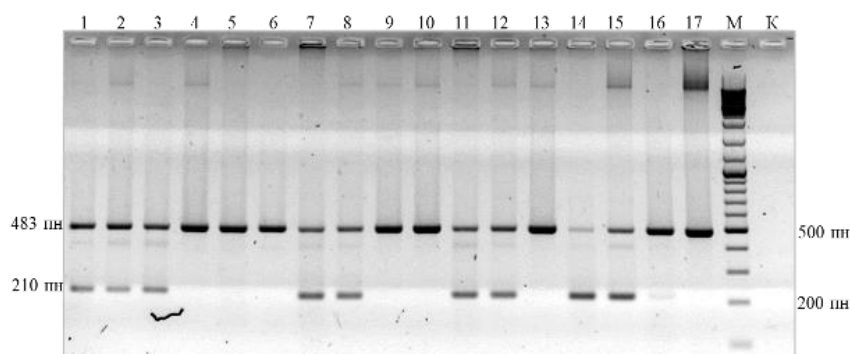


Рис. 7.37. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гібридів пшениці з праймерами до гена *SBEIIa*. Доріжки 1–13, 16 – досліджувані гібриди отримані від схрещування донорної лінії MJ16-112 пшениці твердої із сортом пшениці м'якої; 14–15 – вихідна донорна лінія MJ16-112; 17 – контрольний зразок сорту пшениці 'Куяльник'; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Визначення наявності маркерного гена фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази проводилося за допомогою пари праймерів рекомендованих Сестілі (Sestili et al., 2010). Присутність в геномі шуканого гена *bar* виявлялася наявністю на електрофореграмі амплікону розміром 405 п.н. Типова електрофореграма наведена на рис. 7.38.

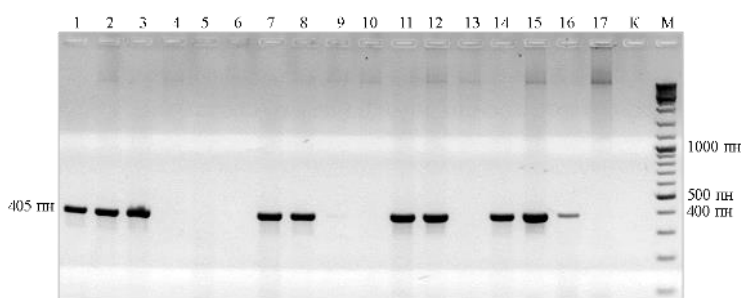


Рис. 7.38. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гібридів пшениці з праймерами до гена *bar*. Доріжки 1–13, 16 – досліджувані гібриди отримані від схрещування донорної лінії MJ16-112 пшениці твердої із сортом пшениці м'якої; 14–15 – вихідна донорна лінія MJ16-112; 17 – контрольний зразок сорту пшениці 'Куяльник'; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

В умовах українського клімату доцільним та перспективним є вирощування пшениці м'якої озимого типу розвитку. Тому проводився контроль наявності D геному в отриманих лініях шляхом детекції раніше досліджених генів *Wx-D1* та *Glu-D1*, які знаходяться у D геномі пшениці. Типові електрофореграми наведені на рис. 7.39 та 7.40.

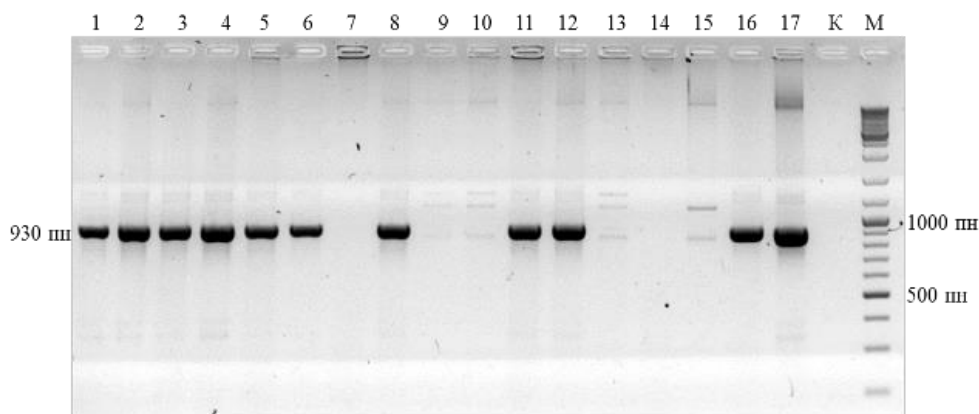


Рис. 7.39. Електрофореграма результатів ампліфікації ДНК гібридів пшениці з праймерами до гена *Wx-D1*. Доріжки 1–13, 16 – досліджувані гібриди отримані від схрещування донорної лінії MJ16-112 пшениці твердої із сортом пшениці м'якої; 14–15 – вихідна донорна лінія MJ16-112; 17 – контрольний зразок сорту пшениці 'Куяльник', який несе алель дикого типу; К – негативний контроль; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

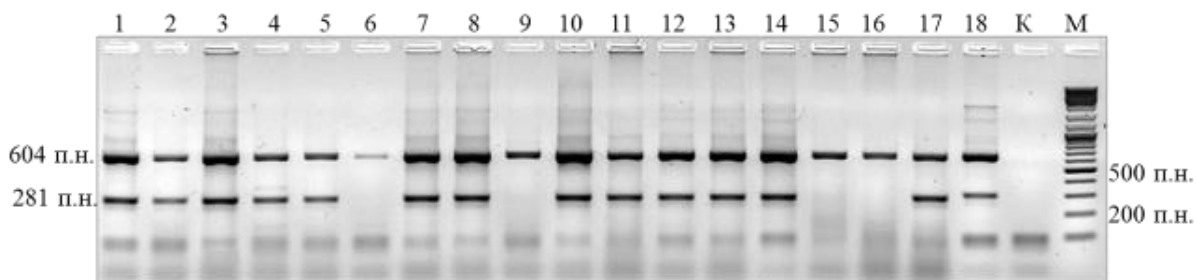


Рис. 7.40. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК гібридів пшениці з праймерами до гена *Glu-D1*. Доріжки 1–14, 17 – досліджувані гібриди отримані від схрещування донорної лінії MJ16-112 пшениці твердої із сортом пшениці м'якої; 15–16 – вихідна донорна лінія MJ16-112; 18 – контрольний зразок сорту пшениці м'якої 'Куяльник'; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Розроблені методики дозволили провести аналіз гібридів першого та другого покоління для відбору ліній із заданими властивостями. Схрещування донорної лінії MJ16-112 пшениці твердої з підвищеним вмістом амілози пройшло більш успішно із сортом пшениці м'якої 'Куяльник', що підтверджується гібридністю всіх досліджуваних зразків.

Серед ліній, отриманих від схрещування із сортом 'Актор', частина ліній не містила бажаного алельного локусу та/або D геном. Серед досліджених 40 гібридів другого покоління було виявлено 30 зразків, які несуть цільовий змінений ген *SBEIIa*. Це підтверджує наявність донорного локусу, який призводить до збільшення накопичення амілози в зерні. У 25 ліній із досліджених було підтверджено наявність D геному. В подальшому молекулярно-генетичний супровід селекційних робіт дозволить отримати лінію пшениці м'яку озиму з підвищеним вмістом амілози в зерні.

7.6. Ідентифікація алелів генів *Psy* пшениці м'якої, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні

Одним з головних чинників, котрий визначає використання зерна для певного виду продуктів є вміст жовтого пігменту, що детермінується переважно накопиченням у зернівках каротиноїдів. Вміст жовтого пігменту – це важлива характеристика якості як твердої (*T. durum* Dest.), так і пшениці м'якої (*T. aestivum* L.). Ця ознака впливає на кінцеву якість і харчову цінність макаронних та хлібопекарських виробів. У селекції пшениці м'якої надають перевагу сортам з яких отримують біле борошно, оскільки жовтий пігмент вважається небажаною характеристикою для хлібопекарської пшениці (Zhang, Dubcovsky 2008; Zhai et al., 2018; Colasuonno et al., 2019). Білий колір борошна є також привабливим для виробництва парового хлібу та китайської пшеничної лапші (He et al., 2004). Колір ендосперму пшениці є визначальним для кольору борошна і контролюється переважно вмістом каротиноїдів у зернівці.

У даній роботі було проведено ідентифікацію алелів генів *Psy1* пшениці, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні, методом полімеразної ланцюгової реакції. Досліджуваним матеріалом виступали 162 зразки пшениці та її співродичі для визначення алельного складу генів *Psy-1*, які кодують фермент фітоїн синтазу.

Серед дослідженої вибірки було виявлено сорти ‘Glenlea’ та ‘Антонівка’ з алелем *Psy-A1b* (рис. 7.41), який відповідно до літературних даних обімовлює низький вміст каротиноїдів у зернівці. Сорти ‘Зимоярка’ і ‘Недра’ не виявили жодного із очікуваних алелів. Алель *Psy-A1c* не був помічений серед досліджених зразків. Решта вибірки несла алель *Psy-A1a*, який визначає високий вміст каротиноїдів.

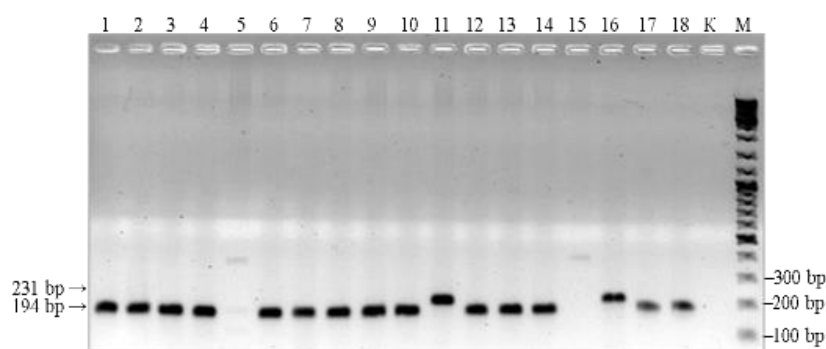


Рис. 7.41. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці з праймерами до гена *Psy-A1*. Доріжка 1 – сорт ‘Древлянка’; 2 – ‘Хуторянка’; 3 – ‘Дворянка’; 4 – ‘Трізо’; 5 – ‘Недра’; 6 – ‘Нива Київщини’; 7 – ‘Тюбальт’; 8 – ‘Торчинська’; 9 – ‘Переяславка’; 10 – ‘Гренні’; 11 – ‘Антонівка’; 12 – ‘Подільська’; 13 – ‘Фаворитка’; 14 – ‘Золотоколоса’; 15 – ‘Зимоярка’; 16 – ‘Glenlea’; 17 – ‘Володарка’; 18 – ‘Новокиївська’; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Маркерна система для виявлення алелів *Psy-B1a* та *Psy-B1b* виявилася недостатньо ефективною і складною в реалізації, оскільки різниця між ампліконами складала лише 4 п.н. і жодна із використаних систем розділення ампліконів не забезпечила достовірного результату. Для оптимізації проведення аналізу було розроблено мультиплексні ПЛР для виявлення алелів *Psy-B1d*, *Psy-B1c* та *Psy-B1e* разом із референтним геном *TaTM20* (рис. 7.42; 7.43). Ген *Psy-D1* серед досліджуваної вибірки був представлений лише алелем *Psy-D1a* (рис. 7.44). І це алель дикого типу.

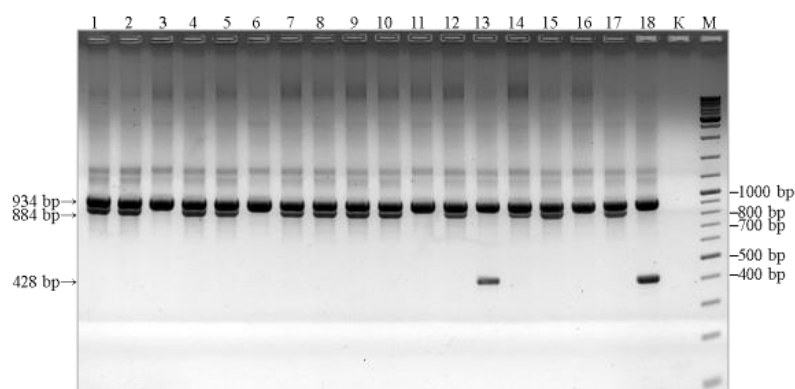


Рис. 7.42. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР для гена *Psy-B1* де ідентифіковано алелі *Psy-B1d* та *Psy-B1c* разом з референтним геном *TaTM20*. Доріжка 1 – сорт ‘Дюк’; 2 – ‘Дворянка’; 3 – ‘Хуторянка’; 4 – ‘Ніконія’; 5 – ‘Хист’; 6 – ‘Нива Київщини’; 7 – ‘Українка’; 8 – ‘Зорепад’; 9 – ‘Переяславка’; 10 – ‘Антонівка’; 11 – ‘Гренні’; 12 – ‘Подяка’; 13 – ‘Недра’; 14 – ‘Ятрань 60’; 15 – ‘Єдність’; 16 – ‘Федерер’; 17 – позитивний контроль з алелем *Psy-B1d*; 18 – позитивний контроль ДНК з алелем *Psy-B1c*; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

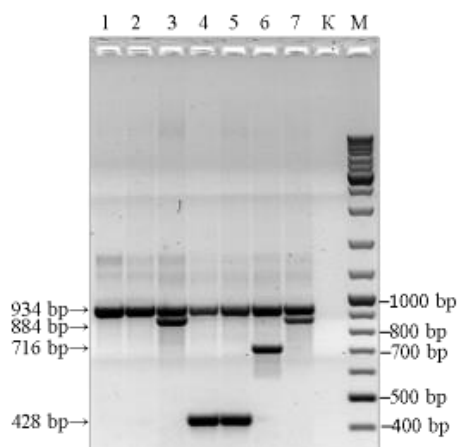


Рис. 7.43. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР для гена *Psy-B1* де одночасно ідентифіковано три алелі – *Psy-B1d*, *Psy-B1c* та *Psy-B1e*, разом з референтним геном *TaTM20*. Доріжка 1 – сорт ‘Хуторянка’; 2 – ‘Аранка’; 3 – ‘Благодарка’; 4 – ‘Доброчинна’; 5 – позитивний контроль, ДНК з алелем *Psy-B1c*; 6 – позитивний контроль, ДНК з алелем *Psy-B1e*; 7 – позитивний контроль, ДНК з алелем *Psy-B1d*; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

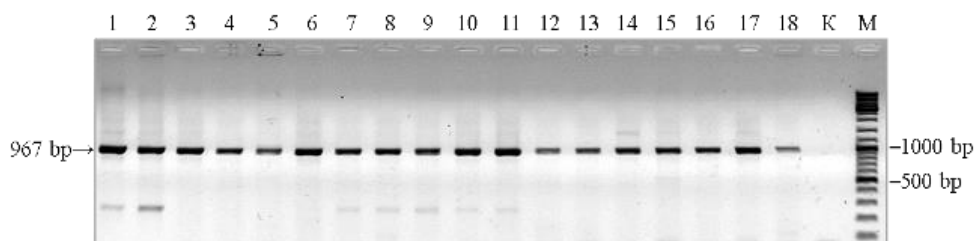


Рис. 7.44. Електрофореграма результатів ампліфікації для гена *Psy-D1*. Доріжка 1 – сорт ‘Древлянка’; 2 – ‘Хуторянка’; 3 – ‘Дворянка’; 4 – ‘Трізо’; 5 – ‘Нива Київщини’; 6 – ‘Тюбальт’; 7 – ‘Торчинська’; 8 – ‘Переяславка’; 9 – ‘Гренні’; 10 – ‘Подільська’; 11 – ‘Зимоярка’; 12 – ‘Золотоколоса’; 13 – ‘Фаворитка’; 14 – ‘Володарка’; 15 – ‘Новокиївська’; 16 – ‘Сонечко’; 17 – ‘Glenlea’; 18 – ‘Смуглянка’; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

Серед проаналізованої вибірки було виявлено 62 зразки, які несуть алель *Psy-B1d*, 14 зразків з алелем *Psy-B1c* та 1 зразок 242/59 Амф 4 з алелем *Psy-B1e*. У деяких зразках з алелем *Psy-B1c* спостерігався додатковий неочікуваний амплікон розміром 900 п.н., що свідчить про додатковий поліморфізм цього гена. Оскільки, за літературними даними, алель *Psy-B1c* відповідає за високий вміст каротиноїдів у зерні, то дана інформація може бути перспективною для проведення подальших досліджень. В цілому, серед проаналізованої вибірки зразків було виявлено сорти і лінії з різним алельним складом генів *Psy-A1* та *Psy-B1*. Разом з тим, ген *Psy-D1* не показав ніяких проявів поліморфізму (табл. 7.15).

Таблиця 7.15

Алельний склад гена *Psy1*, який пов'язаний з накопичуванням каротиноїдів у зерні пшениці

№	Генотип	<i>Psy-A1</i>	<i>Psy-B1</i>	<i>Psy-D1</i>
1	<i>Aegilops cylindrica</i> 220/34	a	a/b	a
2	<i>Aegilops tauschii</i> 232/87	a	d	a
3	Актер	a	a/b	a
4	Альбатрос	a	d	a
5	Amphiploid 4 242/59	a	e	a
6	Антонівка	a	d	a
7	Антонівка 2	b	d	a
8	Аранка	a	a/b	a
9	Bankuti 1201	a	a/b	a
10	Безоста 1	a	a/b	a
11	Білява (Київ)	a	c	a
12	Білява (Одеса)	a	d	a
13	Білоцерківська напівкарликова	a	a/b	a
14	Благодарка	a	d	a
15	Bobwhite (Київ)	a	a/b	a
16	Bobwhite (Одеса)	b	a/b	a
17	Богдана	a	a/b	a
18	Борія	a	a/b	a
19	Борвій	a	d	a
20	Бунчук	a	a/b	a
21	Chinese spring	a	a/b	a
22	Chinese spring 2	a	a/b	a
23	Чорнява	a	a/b	a
24	Чорноброва	a	a/b	a
25	Дальницька	a	d	a
26	Доброчин	a	d	a
27	Доброчинна	a	c	a

№	Генотип	<i>Psy-A1</i>	<i>Psy-B1</i>	<i>Psy-D1</i>
28	Доброслава	a	d	a
29	Донецька 46	a	a/b	a
30	Донецька 48	a	a/b	a
31	Донська напівкарликова	a	a/b	a
32	Досконала	a	a/b	a
33	Древлянка	a	a/b	a
34	Дворянка	a	d	a
35	Дюк	a	d	a
36	Emmer (commer.)	a	a/b	a
37	Emmer (Germany)	a	c	a
38	Emmer (Hungary)	a	a/b	a
39	Епоха	a	d	a
40	Фаворитка	a	a/b	a
41	Федерер	a	a/b	a
42	Glenlea	b	d	a
43	Гренні	a	a/b	a
44	Гармонія	a	a/b	a
45	Гілея	a	a/b	a
46	Годувальниця	a	a/b	a
47	Господиня	a	d	a
48	Грездівлиця	a	a/b	a
49	Гурт	a	d	a
50	Істина	a	d	a
51	Херсонська б/о	a	d	a
52	Хуторянка	a	a/b	a
53	Хист	a	d	a
54	Кірія	a	d	a
55	Княгиня Ольга (Київ)	a	d	a
56	Княгиня Ольга (Одеса)	a	d	a
57	Колега	a	d	a
58	Колумбія	a	a/b	a
59	Корелл	a	a/b	a
60	Косовиця	a	c	a
61	Красень	a	d	a
62	Крижинка	a	a/b	a
63	Куяльник (Київ)	a	a/b	a
64	Куяльник (Одеса)	a	d	a
65	Київська остиста	a	a/b	a
66	Лад	a	d	a
67	Лановий	a	c*	a
68	Ластівка	a	d	a
69	Ласуня	a	a/b	a
70	Лебідка	a	d	a
71	Лідер	a	c	a
72	Ліона	a	d	a
73	Ліра	a	d	a
74	Либідка	a	d	a
75	Литанівка	a	d	a
76	Маркус	a	a/b	a

№	Генотип	<i>Psy-A1</i>	<i>Psy-B1</i>	<i>Psy-D1</i>
77	Місія	a	d	a
78	Миронівська 30	a	a/b	a
79	Миронівська 61	a	a/b	a
80	Миронівська 65	a	a/b	a
81	Миронівська 808	a	a/b	a
82	Наталка	a	a/b	a
83	Наталка (Київ)	a	d	a
84	Небокрай	a	d	a
85	Недра	empty	c	a
86	Ніконія	a	d	a
87	Ніріт	a	a/b	a
88	Норін 16	a	a/b	a
89	Норін 29	a	a/b	a
90	Норін 35	a	a/b	a
91	Новокиївська	a	a/b	a
92	Новосібірська 67	a	a/b	a
93	Новосмуглянка	a	a/b	a
94	Нива	a	d	a
95	Нива Київщини	a	a/b	a
96	Нива Одеська	a	a/b	a
97	Одеська 51 (Київ)	a	c	a
98	Одеська 51 (Одеса)	a	a/b	a
99	Одеська 265	a	c	a
100	Одеська 267 (Київ)	a	a/b	a
101	Одеська 267 (Одеса)	a	a/b	a
102	Осло	a	a/b	a
103	Отаман	a	d	a
104	Панна	a	c	a
105	Переяславка	a	d	a
106	Подяка	a	d	a
107	Подоланка	a	a/b	a
108	Полянка	a	a/b	a
109	Поліська 90	a	a/b	a
110	Польовик	a	d	a
111	Пошана	a	a/b	a
112	Повага	a	c*	a
113	Пилипівка	a	a/b	a
114	Писанка	a	c*	a
115	Пивна	a	a/b	a
116	Селянка	a	c*	a
117	Щедрівка Київська	a	a/b	a
118	Скарбниця (Київ)	a	a/b	a
119	Скарбниця (Одеса)	a	d	a
120	Служниця	a	d	a
121	Смуглянка	a	a/b	a
122	Солоха	a	a/b	a
123	Соломія	a	d	a
124	Соната	a	a/b	a
125	Сонечко	a	d	a

№	Генотип	<i>Psy-A1</i>	<i>Psy-B1</i>	<i>Psy-D1</i>
126	Сотниця	a	a/b	a
127	Спасівка	a	a/b	a
128	Статна	a	a/b	a
129	Супутниця	a	c	a
130	Торчинська	a	a/b	a
131	Трізо	a	a/b	a
132	Трипільська	a	a/b	a
133	Турунчук	a	d	a
134	Тюбальт	a	a/b	a
135	Українка	a	d	a
136	Українська 0246	a	a/b	a
137	Ужинок (Київ)	a	a/b	a
138	Ужинок (Одеса)	a	a/b	a
139	Ватажок	a	a/b	a
140	Веснянка	a	a/b	a
141	Вікторія	a	d	a
142	Золодарка	a	a/b	a
143	Вихованка	a	d	a
144	Ятрань 60	a	d	a
145	Єдність	a	d	a
146	Задумка	a	a/b	a
147	Заграва	a	d	a
148	Заможність	a	d	a
149	Запорука	a	d	a
150	Здобуток	a	a/b	a
151	Землячка (Київ)	a	a/b	a
152	Землячка (Одеса)	a	a/b	a
153	Жайвір	a	d	a
154	Журавка	a	d	a
155	Зміна	a	d	a
156	Знахідка	a	d	a
157	Золото України	a	d	a
158	Золотоколоса	a	a/b	a
159	Зорепад	a	d	a
160	Звитяга	a	a/b	a
161	Зимоярка	empty	a/b	a
162	Зиск	a	d	a

Примітка: * – зразки, які мають додатковий неочікуваний амплікон.

Частоти алелів вивченого гена для українських сортів були наступними: 97,8 % для *Psy-A1a*, 0,8 % для *Psy-A1b*, та 1,4 % для зразків, які не проявили ніяких очікуваних алелів; 47 % для обох алелів *Psy-B1a* і *Psy-B1b* разом, 43,3 % для *Psy-B1d*, і нарешті, 9,7 % для *Psy-B1c*.

Відповідно до інформації, викладеної Ге із співавторами (He et al., 2009), найбільший вміст каротиноїдів спостерігається за наявності алелів

Psy-A1a та *Psy-B1c*. Тож, можна очікувати найвищу концентрацію каротиноїдів у таких сортах як ‘Білява’, ‘Доброчинна’, ‘Косовиця’, ‘Лановий’, ‘Лідер’, ‘Одеська 51’, ‘Одеська 265’, ‘Панна’, ‘Писанка’, ‘Повага’, ‘Полба’ (Німеччина), ‘Селянка’, ‘Супутниця’. Окрім того, наявність 1BL.1RS транслокації також підвищує вміст каротиноїдів у зерні. Серед зразків з алелями *Psy-A1a* та *Psy-B1c* і, відповідно, потенційно високим вмістом каротиноїдів немає зразків, які несли б 1BL.1RS транслокацію. Найменший вміст каротиноїдів очікується у зразків із *Psy-A1b* та *Psy-B1b* та без 1BL.1RS транслокації.

Таким чином, методом ПЛР проаналізовано 162 зразка пшениці та її співродичів і досліджено алельний склад генів *Psy-1*, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні злакових культур. Чітко ідентифіковано сорти з різним алельним складом генів *Psy-A1*, *Psy-B1* і *Psy-D1* та пораховано частоти різних алелів.

7.7. Розробка системи ДНК-маркерів для виявлення алелів генів пшениці, які обумовлюють активність поліфенолоксидазних ферментів

Борошно, отримане із білозерних і червонозерних сортів пшениці має різну здатність до потемніння. Важливу роль у цьому процесі відіграє фермент поліфенолоксидаза (Taranto et al., 2017; Jukanti, 2017). В цілому, потемніння борошна пшениці при виробництві продуктів із тіста – це складний фізіолого-біохімічний процес, обумовлений активністю ферментів о-дифенолоксидази і тирозинази, що каталізують реакції окиснення з утворенням темнозабарвлених меланінів.

Поліфенолоксидазні ферменти призводять до небажаного потемніння та знебарвлення макаронних виробів (Simeone et al., 2002; Morris, 2018), подового хліба (McCallum, Walker 1990; Călinoiu, Vodnar 2018), парових хлібобулочних виробів (Dexter et al., 1984; Taranto et al. 2017). Окрім того висока ПФО активність є також небажаною для більшості класів локшини та

продуктів із замороженого тіста, особливо з борошна білозерних сортів пшениці (Feillet et al., 2000). Відомо, що сорти пшениці твердої мають значно нижчу активність поліфенолоксидази, ніж сорти гексаплоїдної пшениці (*T. aestivum* L.). При цьому, активність ПФО зростає із дозріванням зерна і досягає максимуму в ендоспермі на 21–25 день після запилення. У сухому зрілому зерні пшениці та борошні фермент знаходиться у неактивній формі (Demeke, Morris, 2002).

За синтез ферменту поліфенолоксидази відповідають гени *PPO*, які представлені мультигенним сімейством і розміщуються на різних сайтах (Singh et al., 2009). У багатьох культур, зокрема, картоплі, томату, цукрової тростини, квасолі, гени *PPO* вже клоновані і секвензовані (He et al., 2008; Taranto et al., 2017). Охарактеризовано також структуру генів поліфенолоксидази у різних видів диплоїдної (*T. monococcum*, *T. urartu*, *Aegilops tauschii*, *Ae. speltoides*), тетраплоїдної (*T. turgidum* ssp. *dicoccoides* та *durum*) та гексаплоїдної (*T. aestivum* сорти 'Klasic' та 'ID377s') пшениці (Massa et al., 2007).

Складність оцінки селекційного матеріалу на низьку активність ПФО полягає в існуванні значної кількості генетичних локусів, які обумовлюють активність ПФО. Вид пшениця м'яка (*Triticum aestivum* L.) є аллогексаплоїдним, що має три гомеологічні геноми, кожен з яких містить копію будь-якого гена. Також було виявлено, що пшениця містить багато паралогічних *PPO* генів, які виникли шляхом дуплікації і подальших мутацій (Massa et al., 2007; Fuerst et al., 2008).

Перспективним є створення сортів пшениці, які містять гени з низькою активністю поліфенолоксидази, адже хлібобулочні, макаронні вироби із борошна таких пшениць будуть у меншій мірі підлягати небажаному потемнінню (Chang et al., 2007). Слід зазначити, що вивчення алельного складу генів *PPO* у сортах пшениці української селекції практично не проводилось. Разом з тим, в Україні ініційовано селекційні програми зі створення сортів з низькою активністю поліфенолоксидазних ферментів. Для

ефективної реалізації таких завдань актуальним є використання сучасних методів MAS-селекції.

Для ефективної детекції усіх можливих відомих алелів генів поліфенолоксидазної активності були обрані маркери PPO33 (кодомінантний тип, на ген *Ppo-A1*) та PPO29 і PPO16 (домінантні типи, ген *Ppo-D1*). Для отримання маркерних систем, які будуть ефективними для впровадження у прикладну селекцію, було запропоновано ввести в реакцію праймери до референтного гена *TaTM20*. Оптимізація умов ПЛР здійснювалася шляхом градієнтної ПЛР, за результатами якої були виявлені оптимальні параметри процесу для маркеру PPO33. Для маркеру PPO29 було запропоновано використання техніки низхідної ПЛР. Для маркеру PPO16 не спостерігали бажаних ампліконів, а наявні мінорні не відповідали очікуваним результатам (в порівнянні з маркером PPO29). Отже, для впровадження було запропоновано використовувати дві ПЛР системи на основі маркерів PPO33 та PPO29. Відпрацьовані умови реакцій були наступними:

1. Мультиплексна ПЛР для маркеру PPO33: денатурація 94 °C – 3 хв, 34 цикли: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 59 °C – 30 с, елонгація 72 °C – 1 хв; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів для гена *PPO-A1* у реакції – 0,5 мкМ, для референтного гена *TaTM20* – 0,25 мкМ;

2. Мультиплексна низхідна ПЛР для маркеру PPO29: денатурація 94 °C – 3 хв, 8 циклів: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 68 °C (з кожним циклом температура зменшується на 1 °C) – 30 с, елонгація 72 °C – 1 хв; 24 циклів: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація 61 °C – 30 с, ренатурація 72 °C – 1 хв; завершальна елонгація 72 °C – 5 хв. Кінцева концентрація праймерів для гена *PPO-D1* у реакції – 0,5 мкМ, для референтного гена *TaTM20* – 0,25 мкМ.

Результати типової ПЛР з маркером PPO33 наведені на рис. 7.45. Згідно з (He et al., 2007) очікували амплікони розміром 290 та 481 п.н. для алелів *Ppo-A1a* та *Ppo-A1b*, відповідно. Однак, ми спостерігали амплікони 391 та 582 п.н., які підтверджуються аналізом відповідної послідовності гена

Pro-A1 з Генетичного банку (National Center for Biotechnology Information). Для деяких сортів (зокрема ‘Гілея’, ‘Гурт’, ‘Заграва’) спостерігали наявність двох ампліконів, що може свідчити про гетерогенність матеріалу.

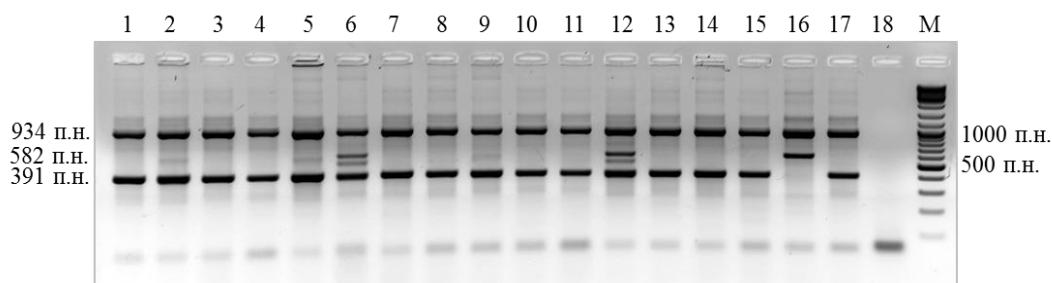


Рис. 7.45. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР з маркером PPO33 для виявлення алелів *Pro-A1a* та *Pro-A1b*. Доріжки 1–15 – досліджувані зразки; 16 – позитивний контроль, лінія 3162 КР (*Pro-A1b*); 17 – позитивний контроль, лінія 3118 КР (*Pro-A1a*); 18 – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для дослідження гетерогенних сортів були проведені ПЛР з ДНК сортів, для яких була характерна ампліфікація ампліконів одного та обох типів, з наступним гідролізом продуктів ампліфікації ендонуклеазою *VamHI* (рис. 7.46). Для гідролізу ампліконів гена *Pro-A1* ендонуклеазою *VamHI* після проведення ПЛР використовували реакційну суміш наступного складу: продукти ампліфікації (10 мкл), ендонуклеаза рестрикції *VamHI* (5 од.) та однократний буфер *VamHI* (Thermo Scientific, 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 5 мМ магнію хлориду, 100 мМ хлориду калію, 0,02 % Тритон X-100, 0,1 мг/мл БСА).

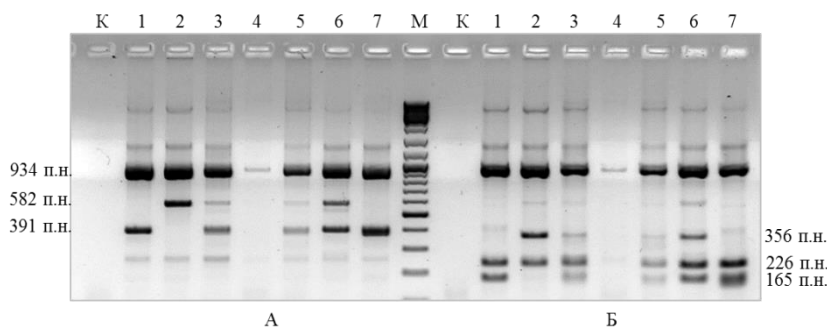


Рис. 7.46. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР гена *Pro-A1* (А) з наступним гідролізом продуктів ампліфікації (Б). Доріжки 1–7 – досліджувані зразки; К – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

За результатами реакції спостерігали гідроліз ампліконів 391 та 582 п.н. (з утворенням фрагментів 165, 226 п.н. та 226, 356 п.н. відповідно) як у випадку наявності на доріжці амплікона одного типу, та і у випадку наявності фрагментів обох розмірів. Це свідчить про гетерогенність даних сортів за геном *Pro-A1*. Результати типової ПЛР з маркером PPO29 наведені на рис. 7.47.

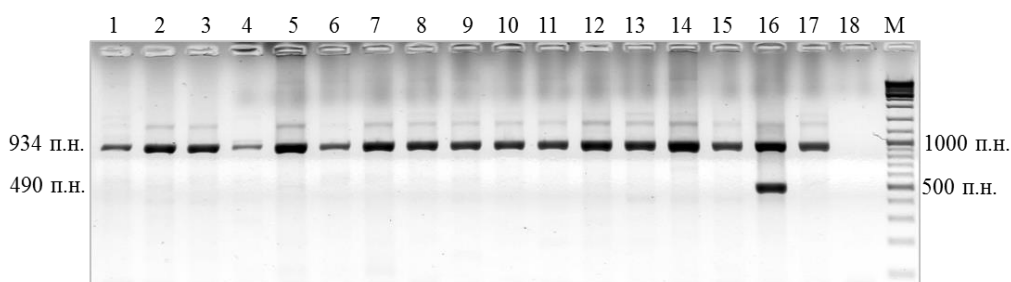


Рис. 7.47. Електрофореграма результатів мультиплексної ПЛР для виявлення алелю *Pro-D1b*. Доріжки 1–15 – досліджувані зразки; 16 – позитивний контроль, сорт ‘Антонівка’ (*Pro-D1b*); 17 – позитивний контроль, лінія 311/081 (*Pro-D1a*); 18 – негативний контроль, без ДНК; М – маркер молекулярної маси DNA Ladder Mix.

Для маркера PPO-29 спостерігали очікуваний амплікон 490 п.н., який показує наявність алелю *b* гена *Pro-D1*. У всіх сортах виявляли амплікон розміром 934 п.н. від референтного гена, що свідчить про ефективність перебігу реакції ампліфікації. Отримані результати доводять ефективність маркерних систем та можливість впровадження їх у прикладну селекцію.

Першим етапом створення сортів пшениці з низькою активністю поліфенолоксидазних ферментів зерна є виявлення донорів бажаних алелів генів *PPO*. Скринінг вибірки сортів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції здійснювали за допомогою розроблених мультиплексних ПЛР. З джерела (He et al., 2007) відомо, що за низьку поліфенолоксидазну активність відповідають алелі *Pro-A1b* та *Pro-D1a*. В результаті дослідження вибірки 143 сортів було виявлено алель *Pro-A1b* лише у сортах ‘Єдність’ та ‘Білява’ (новітній український районований сорт білозерної пшениці), що складає 2,4 % загальної вибірки. У 26 сортів (18,2 % разом) спостерігали

гетерогенність матеріалу, тобто наявність одночасно обох алелів гена. Це було виявлено як в українських сортів ('Антонівка', 'Зимоярка', 'Миронівська 808', 'Панна', 'Фаворитка', 'Хуторянка' та інші), так і в сортах зарубіжного походження ('Аранка', 'Гренні', 'Трізо', 'Тюбальт', 'Chinese Spring', 'Nirit', 'Norin 16', 'Norin 29'), що свідчить про наявність алелю низькоактивної поліфенолоксидази у сортах з різних селекційних центрів. Окрім того, гетерогенність виявлена як в старовинних (напр. 'Миронівська 808'), так і в сучасних сортах. В інших сортах наявний алель *Pro-A1a* високо активної поліфенолоксидази. Необхідно також відмітити, що у білозерному сорті 'Новосибирская 67' був виявлений алель *Pro-A1a*.

У 49 сортах вибірки (34,3 %) був визначений алель *Pro-D1a*, який обумовлює низьку активність поліфенолоксидазних ферментів, у решти – алель *Pro-D1b*. У сорті 'Українська 246' спостерігали наявність алелів обох типів. Отримані дані показують досить високу частоту розповсюдження алеля низької активності гена *Pro-D1*, що можна пояснити імовірним більш раннім потраплянням сорту-носія даного алеля в генетичний пул вітчизняного селекційного матеріалу.

З використанням розроблених підходів було проаналізовано лінії білозерної пшениці. Із 39 зразків – 32 містили алель *Pro-A1a* (82,1 %). У інших ліній були виявлені алелі низької активності поліфенолоксидази *Pro-A1b* (17,9 %). Що стосується геному D, то фрагмент довжиною у 490 п.н., який відповідає алелю *Pro-D1b* зустрічався серед аналізованого матеріалу із частотою у 46,6 %. Тобто, розподіл алелів високої і низької активності поліфенолоксидази виявився приблизно рівним. Результати маркерного аналізу свідчать про перспективність ліній білозерної пшениці для одержання селекційного матеріалу з низькою активністю поліфенолоксидаз.

Аналіз амфідиплоїдів показав, що із 64 проаналізованих зразків у 59 (92,2 %) був наявним алель *Pro-A1a*. Серед них виявлено 5 зразків, які містили амплікони 582 п.н. та близько 500 п.н., які ідентифікувались також у деяких досліджених сортах пшениці. Цікавим виявився розподіл алелів гена

Pro у геномі D. Серед всіх генотипів було визначено лише один зразок, який був носієм алеля високої активності *Pro-D1b*. Це означає, що всі інші зразки досліджуваних амфідиплоїдів містили алель *Pro-D1a* низької активності ферменту.

Отже, використання молекулярно-генетичних маркерів може бути ефективним для аналізу пшениці на наявність алелів, що відповідають за активність поліфенолоксидази. Такий підхід є сучасним і перспективним для створення сортів пшениці з новими оригінальними ознаками.

7.8. Розробка системи ДНК-маркерів для ідентифікації центричних пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS, 1AL.1RS та 1BL.1RSm

Серед сортів, ліній та іншого селекційного матеріалу пшениці м'якої, що містять гени, одержані в результаті міжвидової та міжродової гібридизації, особливе місце займають генотипи з пшенично-житніми транслокаціями (Lukaszewski et al., 1982). Поширення одержали сорти м'якої пшениці, що містять пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS, меншою мірою – транслокацію 1AL.1RS (Lukaszewski, 1990; Rabinovich, 1998; Shlegel, 2010). Сорти пшениці з 1BL.1RS транслокацією як правило містять гени, які контролюють стійкість до таких грибних патогенів як бура іржа (*Lr26*), стеблова іржа (*Sr31*), жовта іржа (*Yr9*), борошниста роса (*Pm8*) (Singh et al., 1990; McIntosh et al., 2003) та інші гени стійкості до хвороб та шкідників (Meltz et al., 1992). Транслокація 1AL.1RS набула розповсюдження серед комерційних сортів завдяки присутності генів стійкості до біотипів попелиці (*Gb2*, *Gb6*), борошнистої роси (*Pm17*), кліща (Козуб та ін., 2005).

Виявлення сортів озимої м'якої пшениці з житніми транслокаціями та їх застосування у селекційних програмах є важливим етапом створення нового вихідного матеріалу з покращеними господарсько-цінними ознаками. Ідентифікація пшенично-житніх транслокацій можлива різними методами. В останній час достатньо ефективними способами визначення чужорідного генетичного матеріалу у геномі пшениці є молекулярно-генетичне ДНК-

Специфічні праймери до локусів *Xrems 1303* та *Sec-1* детектують фрагменти ампліфікації ДНК розміром 290 п.н. та 400 п.н. і є маркерами звичайної пшенично-житньої транслокації. Результати ПЛР-аналізу з використанням праймерів до локусу *Xrems 1303* та аналіз електрофореграми (рис. 7.49) засвідчили, що сорти ‘Золотоколоса’ (доріжки А 4, 5, 6), ‘Фаворитка’ (А 7, 8, 9), ‘Смуглянка’ (В 1, 2, 3) і ‘Крижинка’ (В 4, 5, 6) містять амплікон довжиною 290 п.н. Це підтверджує наявність у геномі цих сортів пшениці короткого плеча хромосоми 1R жита. Для сорту ‘Альбатрос одеський’ (А 1, 2, 3) показана відсутність амплікону такої довжини.

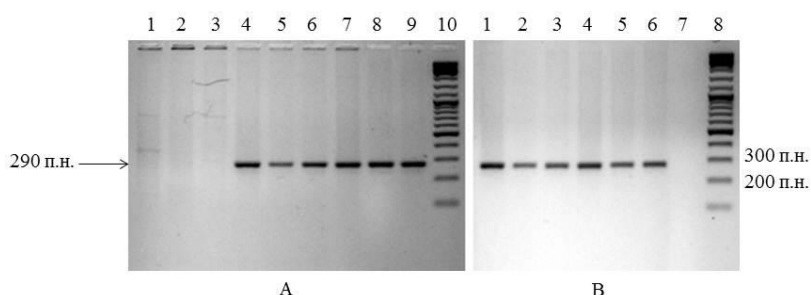


Рис. 7.49. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці м'якої з праймерами до локусу *Xrems 1303*. Доріжки А 1–3 – сорт ‘Альбатрос одеський’; А 4–6 – ‘Золотоколоса’; А 7–9 – ‘Фаворитка’; В 1–3 – ‘Смуглянка’; В 4–6 – ‘Крижинка’; В 7 – негативний контроль, ТЕ-буфер без додавання ДНК; А 10, В 8 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix (Fermentas).

Локус *Sec-1* детектується ампліконом довжиною 400 п.н. і визначає синтез житніх білків ω -секалінів, що можливе лише за наявності пшенично-житньої транслокації у зазначених сортів. Аналіз ДНК досліджуваних сортів пшениці із застосуванням праймерів до локусу *ω -secalin* виявив амплікони довжиною 400 п.н. (рис. 7.50) у сортів ‘Золотоколоса’ (3, 4), ‘Фаворитка’ (5, 6), ‘Смуглянка’ (7, 8) і ‘Крижинка’ (9, 10). У сорта ‘Альбатрос одеський’ (1, 2) не знайдено ампліконів такої довжини, що свідчить про відсутність пшенично-житньої транслокації в даному сорті пшениці.

Особливого значення набувають методи, що дозволяють ідентифікувати в одній реакції декілька ділянок ДНК, що обмежені різними парами праймерів.

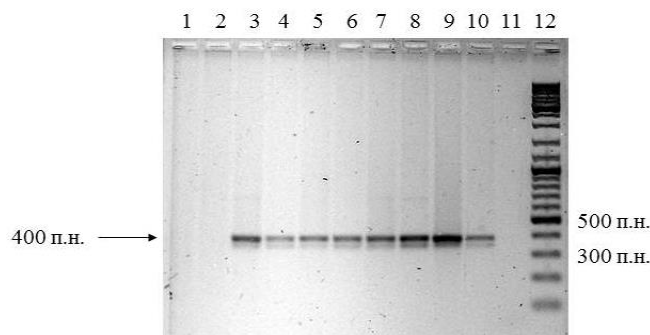


Рис. 7.50. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів м'якої пшениці з праймерами до локусу *ω-secalin*. Доріжки 1, 2 – сорт 'Альбатрос одеський'; 3, 4 – 'Золотоколоса'; 5, 6 – 'Фаворитка'; 7, 8 – 'Смуглянка'; 9, 10 – 'Крижинка'; 11 – негативний контроль, ТЕ буфер без додавання ДНК; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix (Fermentas).

У нашу роботу були залучені мультиплексні ПЛР до гена *TaTM20* та локусу *Xrems 1303*, а також до гена *TaTM20* та локусу *ω-secalin*. Локус *Xrems 1303* виявляється у сортів, що несуть як звичайну пшенично-житню транслокацію, так і у генотипів з модифікованою пшенично-житньою конструкцією 1RSm.1BL (рис. 7.51).

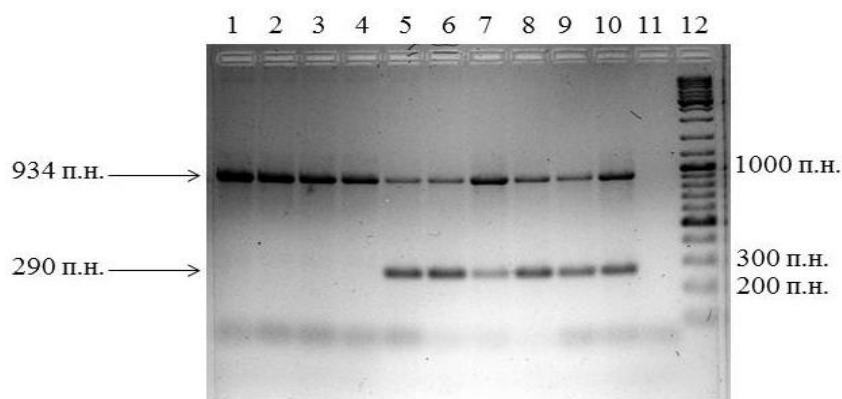


Рис. 7.51. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці м'якої з праймерами до гена *TaTM20* та локусу *Xrems 1303*. Сорти пшениці, які використовувалися в дослідженнях, без транслокації: 1 – 'Нива Київщини'; 2 – 'Тюбальт' (яра); 3 – 'Торчинська' (яра); 4 – 'Переяславка'. Сорти із звичайною пшенично-житньою транслокацією: 5 – 'Золотоколоса'; 6 – 'Смуглянка'; 7–10 – генотипи з присутнім модифікованим 1RS плечем жита; 11 – негативний контроль, ТЕ буфер; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix (Fermentas).

Проф. А. Лукашевським шляхом хромосомної інженерії було створено оригінальні транслокантні форми (1RSm. 1BL), у яких замість 1RS плеча

жита міститься модифікована 1RSm конструкція. Від оригінального плеча жита вона відрізняється двома інтеркалярними вставками, які являють собою фрагменти плеча пшеничної хромосоми і характеризуються відсутністю локусу *Sec-1*. Використання ліній з модифікованою транслокацією вважається перспективним у селекції пшениці (Моцний та ін., 2012).

У сортів ‘Нива Київщини’, ‘Тюбальт’, ‘Торчинська’, ‘Переяславка’, які не містять пшенично-житніх транслокацій, при ампліфікації фрагменти довжиною 290 п.н. не визначаються. У генотипах пшениці з модифікованим 1RS плечем жита (рис. 7.51 доріжки 7–10) також не детектуються специфічні амплікони розміром 400 п.н., що свідчить про відсутність локусу *ω-secalin* у досліджуваних зразках.

Результати мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з праймером до локусу *ω-secalin* (рис. 7.52) свідчать про наявність цього локусу лише у сортів ‘Золотоколоса’ та ‘Смуглянка’, які містять звичайну пшенично-житню транслокацію.

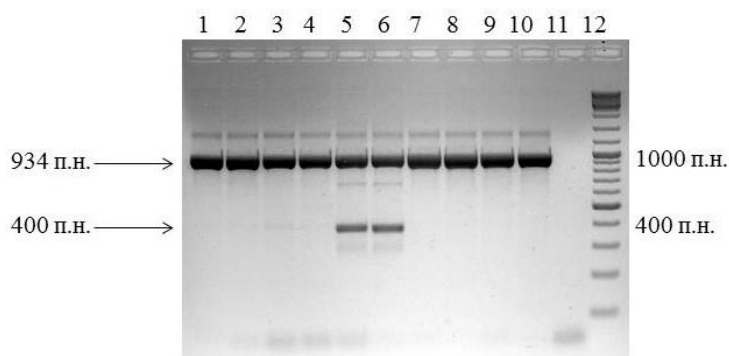


Рис. 7.52. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці м'якої з праймерами до гена *TaTM20* та локусу *ω-secalin*. Сорти пшениці, які використовувалися в дослідженнях, без транслокації: 1 – ‘Нива Київщини’; 2 – ‘Тюбальт’ (яра); 3 – ‘Торчинська’ (яра); 4 – ‘Переяславка’. Сорти із звичайною пшенично-житньою транслокацією: 5 – ‘Золотоколоса’; 6 – ‘Смуглянка’; 7–10 – генотипи пшениці з присутнім модифікованим 1RS плечем жита; 11 – негативний контроль, ТЕ буфер; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix (Fermentas).

Використовуючи мультиплексні полімеразні ланцюгові реакції, була показана наявність плеча 1RS жита у сортах ‘Колумбія’, ‘Чорнява’, ‘Фаворитка’, ‘Спасівка’, ‘Гілея’, ‘Золотоколоса’, ‘Смуглянка’ і

‘Новокиївська’. Сорти ‘Ятрань 60’ та ‘Куяльник’ не мають транслокацій (рис. 7.53; 7.54).

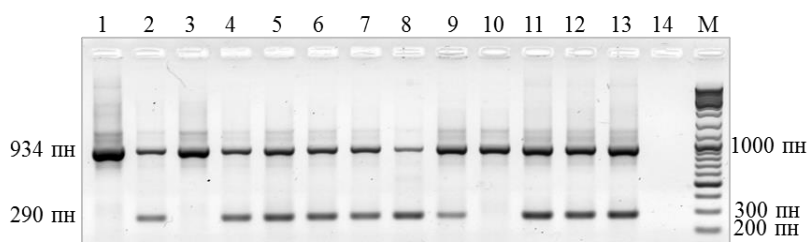


Рис. 7.53. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці м'якої з праймерами до гена *TaTM20* та локусу *Xrems 1303*: 1 – ‘Ятрань 60’; 2 – ‘Колумбія’; 3 – ‘Куяльник’; 4 – ‘Чорнява’; 5, 6 – ‘Фаворитка’; 7 – ‘Спасівка’; 8 – ‘Гілея’; 9, 10 – ‘Хуторянка’; 11 – ‘Золотоколоса’; 12 – ‘Смуглянка’; 13 – ‘Новокиївська’; 14 – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix.

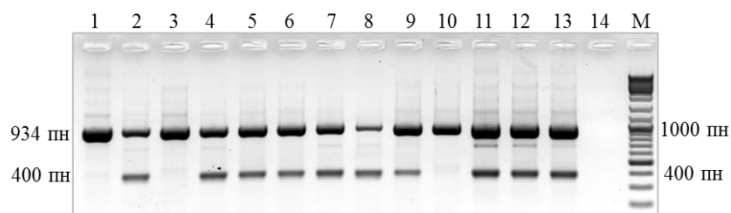


Рис. 7.54. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів м'якої пшениці з праймерами до гена *TaTM20* та локусу *Sec-1*: 1 – ‘Ятрань 60’; 2 – ‘Колумбія’; 3 – ‘Куяльник’; 4 – ‘Чорнява’; 5, 6 – ‘Фаворитка’; 7 – ‘Спасівка’; 8 – ‘Гілея’; 9, 10 – ‘Хуторянка’; 11 – ‘Золотоколоса’; 12 – ‘Смуглянка’; 13 – ‘Новокиївська’; 14 – негативний контроль, ТЕ буфер; М – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix.

Слід зауважити, що при використанні молекулярних маркерів до локусу *Sec-1* фрагменти ампліфікації детектуються як у випадку наявності транслокації у першій хромосомі геному А пшениці (1AL.1RS), так і геному В (1BL.1RS). Для розділення сортів за наявністю транслокацій у різних хромосомах пшениці, було підібрано умови реакції ампліфікації для виявлення у них мікросателітного локусу жита *SCM9*, який за присутності амплікона у 226 п.н. вказує на транслокацію 1AL.1RS, а амплікона у 206 п.н. – 1BL.1RS (рис. 7.55).

Результати ПЛР-аналізу засвідчують, що сорти ‘Ятрань 60’ та ‘Куяльник’ не містять пшенично-житньої транслокації. На це вказує відсутність продуктів ампліфікації житнього локусу *SCM9*.

Сорти ‘Колумбія’, ‘Чорнява’, ‘Спасівка’, ‘Гілея’, ‘Хуторянка’, ‘Золотоколоса’ і ‘Смуглянка’ є носіями транслокації 1AL.1RS, а сорти ‘Фаворитка’ та ‘Новокиївська’ – 1BL.1RS. Таким чином, використання незалежних праймерів до локусів, розташованих у транслокованому плечі хромосоми 1R жита, дозволило підтвердити достовірність виявлення житньої транслокації та можливості використання молекулярних систем для аналізу сортового та селекційного матеріалу.

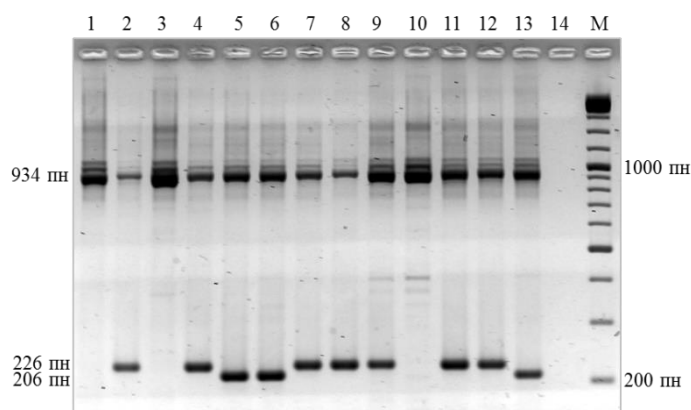


Рис. 7.55. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці м'якої з праймерами до гена *TaTM20* та локусу *SCM9*: 1 – ‘Ятрань 60’; 2 – ‘Колумбія’; 3 – ‘Куяльник’; 4 – ‘Чорнява’; 5, 6 – ‘Фаворитка’; 7 – ‘Спасівка’; 8 – ‘Гілея’; 9, 10 – ‘Хуторянка’; 11 – ‘Золотоколоса’; 12 – ‘Смуглянка’; 13 – ‘Новокиївська’; 14 – негативний контроль, TE буфер; M – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA LadderMix.

Визначення наявності пшенично-житньої транслокації проводили також методом електрофорезу гліадинової фракції білків. Типова електрофореграма їх розділення наведена на рис. 7.56. Ефект присутності центричних хромосомних пшенично-житніх транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS на електрофореграмі детектується за специфічними гліадиновими компонентами за принципом альтернативного заміщення. Так, специфічним маркером для локусу *Gli-A1* (плече 1AS), який альтернативно заміщується транслокаційним плечем 1RS житньої хромосоми 1R, є гліадиновий компонент, позначений на рис. 7.56 стрілкою зліва. У генотипів з транслокацією 1AL.1RS цей компонент відсутній.

Специфічним маркером для локусу *Gli-B1* є гліадиновий компонент, позначений на рис. 7.56 стрілкою справа. У генотипів з транслокацією

1BL.1RS цей компонент відсутній. Отже, типовими гомогенними генотипами (сортами) з транслокацією 1AL.1RS є зразки, представлені на доріжках 2, 3, 5, 6, 9–12, 15–18. Генотипи на доріжках 13 і 14, очевидно, гетерогенні за транслокацією, оскільки інтенсивність прояву характерних для транслокації 1AL.1RS маркерних гліадинів є нижчою, ніж у гомогенних.

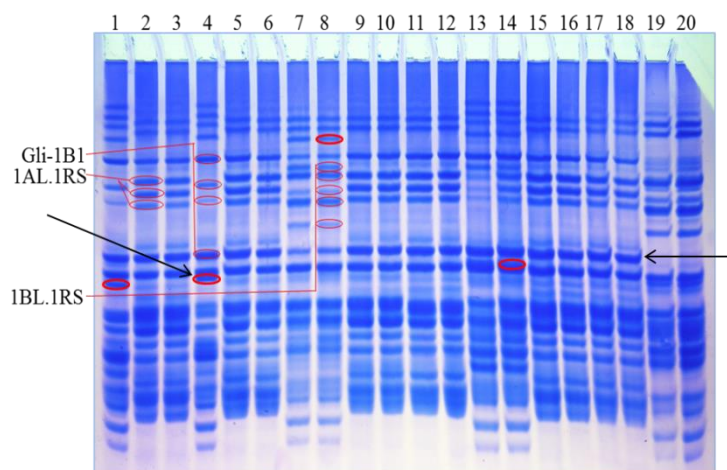


Рис. 7.56. Електрофореграма гліадинової фракції білків у сортів пшениці: 1 – ‘Ятрань 60’; 2, 3 – ‘Колумбія’; 4 – ‘Куяльник’ (стандарт); 5, 6 – ‘Чорнява’; 7, 8 – ‘Фаворитка’; 9, 10 – ‘Спасівка’; 11, 12 – ‘Гілея’; 13, 14 – ‘Хуторянка’; 15, 16 – ‘Золотоколоса’; 17, 18 – ‘Смуглянка’; 19, 20 – ‘Новокиївська’.

Таблиця. 7.16

Розподіл сортів озимої пшениці за 1AL.1RS та 1BL.1RS транслокаціями

№	Сорт	ДНК аналіз	Білковий аналіз
1	Ятрань 60	-	-
2	Колумбія	1AL.1RS	1AL.1RS
3	Куяльник	-	-
4	Чорнява	1AL.1RS	1AL.1RS
5	Фаворитка	1BL.1RS	1BL.1RS
6	Спасівка	1AL.1RS	1AL.1RS
7	Гілея	1AL.1RS	1AL.1RS
8	Хуторянка	1AL.1RS/-	1AL.1RS/-
9	Золотоколоса	1AL.1RS	1AL.1RS
10	Смуглянка	1AL.1RS	1AL.1RS
11	Новокиївська	1BL.1RS	1BL.1RS

Типовими генотипами з транслокацією 1BL.1RS є зразки на доріжках 19 та 20 (сорт ‘Новокиївська’). Сорт ‘Фаворитка’ (доріжки 7 та 8) є не гомогенним за транслокацією 1BL.1RS, оскільки на одній з доріжок

інтенсивність прояву білків-секалінів, що є маркерами для локусу *Sec-1*, знижена. Крім того, проаналізовані генотипи містять маркерний гліадин для пшеничного локусу *Gli-B1*. Результати проведених досліджень підсумовані у табл. 7.16.

Для підтвердження кодомінантності даної маркерної системи було створено модель гетерозиготи шляхом об'єднання (у рівних кількостях) загальної ДНК сортів 'Колумбія' (1AL.1RS) та 'Фаворитка' (1BL.1RS). Результати проведеної реакції представлено на рис. 7.57.

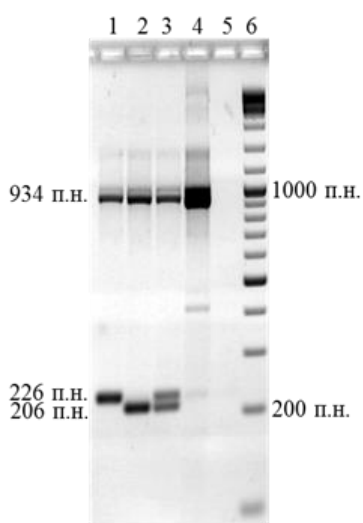


Рис. 7.57. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів м'якої пшениці з праймерами SCM9F і SCM9R з модельною гетерозиготою: 1 – 'Колумбія' (1AL.1RS); 2 – 'Фаворитка' (1BL.1RS); 3 – 'Колумбія' (1AL.1RS) + 'Фаворитка' (1BL.1RS); 4 – 'Ятрань 60' (без транслокації); 5 – негативний контроль, TE буфер; 6 – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix.

Відомо (Yediyay et al., 2010), що у випадку, коли донором транслокації виступала пшениця сорту 'Salmon', у сортів з 1BL.1RS за використання праймерів SCM9F/R можна спостерігати не характерний амплікон 226 п.н. Тому, для підтвердження адекватності попередньо отриманих результатів з цими праймерами була використана інша маркерна система, основу якої складають праймери PAWS5 та PAWS6, що визначають жито-специфічні повтори ДНК родини генів *R173*. Відомо, що ця родина є поліморфною, складається із 15 000 копій на диплоїдний геном жита і у випадку її походження із жита сорту 'Petcus' розташована між центромерою і локусом *Sec-1* короткого плеча хромосоми 1R (Rogowsky et al., 1992). Такий підхід дозволяє проводити аналіз сортів, враховуючи множинні джерела пшенично-житніх транслокацій (Weng et al., 2007). Типова електрофореграма

мультиплексної ПЛР за використання цільових праймерів PAWS5/S6 представлена на рис. 7.58.

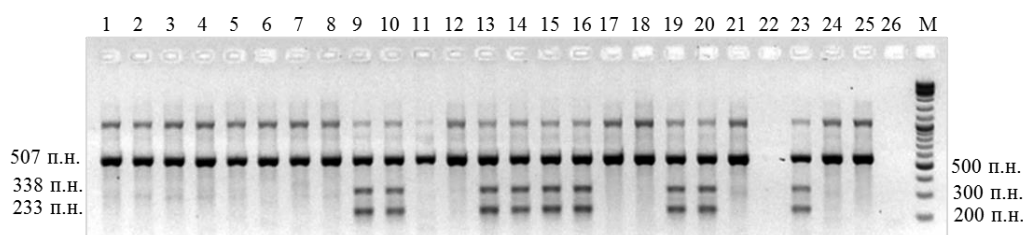


Рис. 7.58. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів м'якої пшениці з праймерами PAWS5 та PAWS6: 1, 2 – ‘Миронівська 61’; 3, 4 – ‘Новокиївська’; 5, 6 – ‘Трипільська’; 7, 8 – ‘Миронівська 65’; 9, 10 – ‘Золото України’; 11, 12 – ‘Здобуток’; 13, 14 – ‘Грездівлиця’; 15, 16 – ‘Доброслава’; 17, 18 – ‘Лідер’; 19, 20 – ‘Новосмуглянка’; 21, 22 – ‘Соломія’; 23 – ‘Колумбія’; 24 – ‘Фаворитка’ (1BL.1RS); 25 – ‘Ятрань 60’ (без транслокації); 26 – негативний контроль, ТЕ буфер; 27 – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix.

Таблиця 7.17

Список виявлених сортів з транслокаціями 1AL.1RS та 1BL.1RS

Сорт	Тип транслокації	Сорт	Тип транслокації
Борія	1AL.1RS	Миронівська 808	1AL.1RS
Веснянка	1AL.1RS	Новокиївська	1BL.1RS
Гілея	1AL.1RS	Новосмуглянка	1AL.1RS
Грездівлиця	1AL.1RS	Пивна	1BL.1RS
Доброслава	1AL.1RS	Полянка	1AL.1RS
Золото України	1AL.1RS	Пошана	1AL.1RS
Золотоколосо	1AL.1RS	Славна	1AL.1RS
Київська остиста	1BL.1RS	Смуглянка	1AL.1RS
Княгиня Ольга	1AL.1RS	Соломія	1BL.1RS
Колумбія	1AL.1RS	Солоха	1AL.1RS
Крижинка	1BL.1RS	Сотниця	1AL.1RS
Ластівка	1AL.1RS	Спасівка	1AL.1RS
Миронівська 30	1BL.1RS	Трипільська	1BL.1RS
Миронівська 61	1BL.1RS	Фаворитка	1BL.1RS
Миронівська 65	1BL.1RS	Чорнява	1AL.1RS

Аналіз одержаних результатів засвідчує, що використання праймерів до родини *R173* жито-специфічних повторів ДНК виявляє у частини сортів існування ампліконів довжиною 233 п.н. та 338 п.н., що підтверджує існування в їх геномі транслокації 1AL.1RS (Yediay et al., 2010). У даному випадку, це сорти ‘Золото України’, ‘Грездівлиця’, ‘Доброслава’,

‘Новосмуглянка’ та використаний у якості контролю на транслокацію 1AL.1RS сорт ‘Колумбія’. Список сортів з транслокаціями наведений в табл. 7.17.

Проведені молекулярно-генетичні дослідження показали, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації.

Таким чином, застосування методу полімеразної ланцюгової реакції дозволило ідентифікувати пшенично-житню транслокацію у сортах пшениці, що свідчить про можливість використання ДНК-технологій у селекційно-генетичних програмах. Показано, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Поєднання різних використаних методів дозволяє виявляти гетерогенність рослинного матеріалу, що є важливим при складанні селекційних програм. Проведені молекулярно-генетичні дослідження показали, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації.

7.8.1. Дослідження мейозу у сортів пшениці для визначення пшенично-житньої транслокації

Для характеристики рослинного матеріалу з пшенично-житніми транслокаціями впроваджують також класичні методи цитогенетичного аналізу. Дослідження поведінки хромосом в мейозі дозволяє визначати наявність чужорідного матеріалу в геномах інтрогресивних сортів пшениці, а

також рівень їх цитологічної стабільності. Вважається, що для стабільних сортів нормою у профазі першого мейотичного поділу є наявність 21 бівалента, тетради – без порушень. У той же час у сортів, отриманих за інтрогресивної селекції, перебіг мейозу часто відбувається з порушеннями, що виявляються у змінах синапсису, утворенні відкритих бівалентів, появі різної кількості унівалентів, нерівномірному розходженні хромосом, внаслідок порушення роботи веретена поділу, формуванні діад та тетрад з мікроядрами, появі поліад та інш. (Гордеева и др., 2009; Мощный и др., 2012; Силкова и др., 2014; Орловская и др., 2015). Викликати порушення кон'югації хромосом в метафазі I може і чужорідна цитоплазма (Мухордова, 2000). Так, використання цитологічного аналізу, а саме, дослідження мейотичних конфігурацій хромосом у метафазі I гібридів F_1 дозволило виявити наявність хромосомних заміщень і транслокацій у каріотипах інтрогресивних ліній озимої пшениці (Мощный, Чеботарь и др., 2012). Метою даної частини роботи було дослідження мейозу у сортів пшениці з пшенично-житніми транслокаціями.

Результати аналізу характеру кон'югації хромосом у метафазі I сортів з різними транслокаціями засвідчили, що у всіх генотипів утворювались бівалентні асоціації, представлені в основному закритими ($21^{\text{II}}_{\text{З}}$) та відкритими бівалентами ($20^{\text{II}}_{\text{З}} + 1^{\text{II}}_{\text{В}}$, $19^{\text{II}}_{\text{З}} + 2^{\text{II}}_{\text{В}}$, зрідка $18^{\text{II}}_{\text{З}} + 3^{\text{II}}_{\text{В}}$) (рис. 7.59 а). При цьому у всіх сортів спостерігали переважання закритих бівалентів, що свідчить про високу інтенсивність процесу синапсису (табл. 7.18). Наявність відкритих бівалентів вказує на послаблення синапсису.

У каріотипах всіх зазначених сортів на даній стадії спостерігали також мікроспороцити із унівалентними хромосомами, головним чином, з двома ($20^{\text{II}} + 2\text{у}$), що є основним типом порушень мейозу на даній стадії (рис. 7.59 б). Частота клітин з унівалентами як у сортів, носіїв транслокації 1AL.1RS, так і носіїв транслокації 1BL.1RS не перевищувала 5 %, що є в межах норми для інтрогресивних сортів.

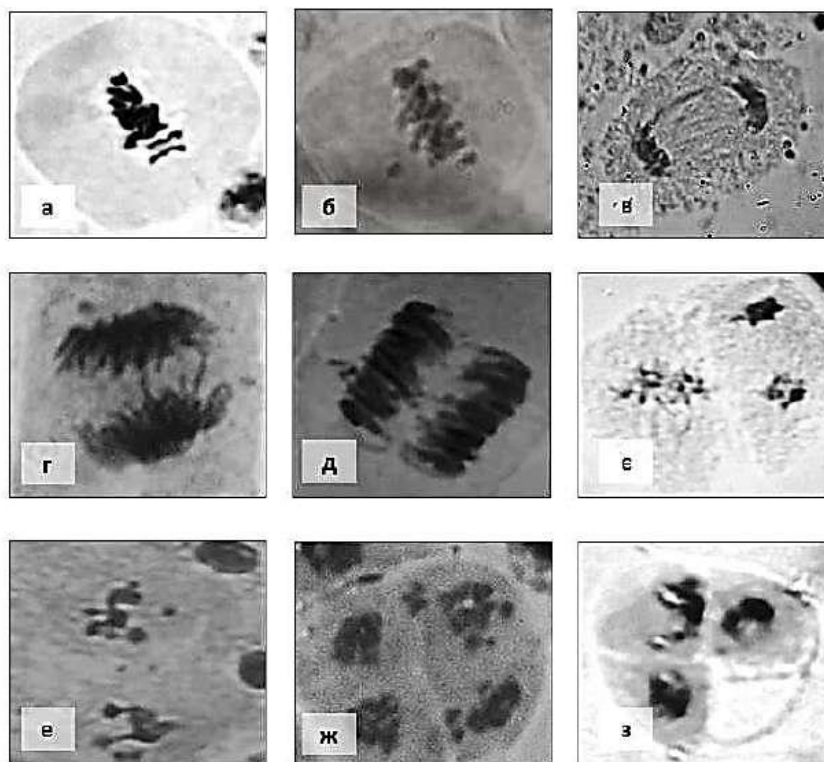


Рис. 7.59. Порушення мейозу в сортів пшениці м'якої озимої – носіїв транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS: **а** – закриті та відкриті біваленти, **б** – наявність 2-х унівалентів; **в** – хроматидний міст; **г** – множинні порушення в анафазі 1 (міст, викид хромосом та відстала хромосома); **д** – анафаза 1 з викидом хромосом; **е** – анафаза 2 з асинхронним поділом; **є** – клампінг хромосом; **ж** – тетрада з мікроядрами; **з** – тетрада з відсутньою мікроспорою.

Поява унівалентів пов'язана з послабленням або відсутністю кон'югації (асинапсис) між гомологічними хромосомами і вказує на наявність транслокацій або заміщень (Силкова и др., 2014; Орловская и др., 2015), а також на цитологічну нестабільність таких матеріалів, якщо їх вміст перевищує 5 % (Моцный и др., 2012). В мейоцитах з унівалентами відбувається в основному випадкове розходження хромосом до полюсів в анафазі першого мейозу, що в подальшому може призводити до утворення неповноцінних гамет. Відсутність кон'югації і утворення унівалентів дослідники пояснюють мутаціями в генах, що контролюють синапсис (Сидорчук и др., 2008); інтрогресією значної кількості чужорідного матеріалу; цитоміксісом та ін. (Соснихина и др., 2007). Слід зазначити, що у сортів 'Миронівська 61', 'Спасівка' та 'Полянка' виявили поодинокі клітини з асоціаціями хромосом $21^{\text{II}}+1\text{y}$, $20^{\text{II}}+3\text{y}$, $19^{\text{II}}+3\text{y}$, що вказує на наявність в каріотипах цих сортів анеуплоїдних клітин чи телосоміків.

Таблиця 7.18

Асоціації хромосом різних сортів пшениці в першій метафазі мейозу

Сорт	Проаналізовано метафаз, шт	Кількість метафаз із закритими бівалентами, %	Кількість метафаз із відкритими бівалентами, %	Кількість клітин з унівалентами, %
Одеська 267	178	99,4 ± 0,6	0,6 ± 0,6	-
Сорти з транслокацією 1BL.1RS				
Миронівська 61	58	84,5 ± 4,7*а	13,8 ± 4,5	1,7 ± 1,7
Миронівська 65	49	81,6 ± 5,5	14,3 ± 5,0	4,1 ± 2,8
Фаворитка	53	88,6 ± 4,4*б	11,4 ± 4,4*	-
Новокиївська	56	67,8 ± 6,4*а,б	27,9 ± 6,0*	4,3 ± 2,7
Сорти з транслокацією 1AL.1RS				
Золотоколоса	48	93,7 ± 3,5*	6,3 ± 3,5*	-
Княгиня Ольга	54	77,7 ± 5,6	20,4 ± 5,5	1,9 ± 1,8
Полянка	47	80,1 ± 5,8	17,7 ± 5,6	2,2 ± 2,2
Спасівка	43	65,3 ± 7,3*	29,8 ± 6,9*	4,9 ± 3,3

Примітка: * Різниця між сортами достовірна при $p \leq 0,05$.

На стадіях А1–А2 порушення мейозу у всіх досліджуваних сортів були представлені, головним чином, типовими хромосомними абераціями – в основному фрагментами та мостами (рис. 7.59 в, г). Аномалії мейозу, пов’язані з порушенням веретена поділу, були представлені викидом або відставанням хромосом (рис. 7.59 д). Кількість клітин з порушеннями в сортів – носіїв транслокації 1BL.1RS коливалась від 3,6 % у сорту ‘Фаворитка’ до 5,8 % у сорту ‘Новокиївська’. У сортів з транслокацією 1AL.1RS від 2,1 % (сорт ‘Золотоколоса’) до 6,1 % (сорт ‘Полянка’) (табл. 7.19). Основним типом порушень на стадії А2 був асинхронний поділ в діадах, коли в одній клітині проходила стадія метафази, в другій — пізньої анафази/ранньої телофази (рис. 7.59 є).

На останній стадії мейозу телофазі 2 утворюються тетради, в яких чітко проявляються наслідки порушень, що відбулися протягом перших фаз мейозу у вигляді мікроядер в тетрадах, мікроспороцитів з різними за величиною ядрами, відсутності 1–2 мікроспор, появі поліад та ін.

Таблиця 7.19

Порушення мейозу, що відбувалися на стадіях A1 та A2

Сорт	Кількість вивчених клітин, шт	Кількість клітин з аномаліями мейозу, %	З них				
			Відсталі хромосоми, %	Фрагменти, %	Мости, %	Викид хромосом, %	Асинхронний поділ, %
Одеська 267	390	0,8 ± 0,8	-	0,8 ± 0,8	-	-	-
Сорти з транслокацією 1BL.1RS							
Миронівська 61	488	5,2 ± 1,0	0,4 ± 0,3	1,2 ± 0,5	0,8 ± 0,4	-	2,8 ± 0,7
Миронівська 65	516	4,7 ± 0,9	0,4 ± 0,3	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,4	0,2 ± 0,2	1,7 ± 0,8
Фаворитка	495	3,6 ± 0,8	0,2 ± 0,2	1,4 ± 0,5	0,8 ± 0,4	-	1,2 ± 0,5
Новокиївська	447	5,8 ± 1,0	0,6 ± 0,4	1,6 ± 0,6	1,1 ± 0,5	0,4 ± 0,3	2,0 ± 0,7
Сорти з транслокацією 1AL.1RS							
Золотоколоса	328	2,1 ± 0,8*	-	1,2 ± 0,6	0,3 ± 0,3	-	0,6 ± 0,4*
Княгиня Ольга	504	4,0 ± 0,9	0,8 ± 0,4	1,4 ± 0,5	0,6 ± 0,3	0,2 ± 0,2	1,0 ± 0,4
Полянка	508	6,1 ± 1,1*	0,6 ± 0,3	1,8 ± 0,6	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,4	2,4 ± 0,7*
Спасівка	310	5,5 ± 1,3*	1,0 ± 0,3	1,6 ± 0,7	1,0 ± 0,3	-	1,9 ± 0,8

Примітка: * Різниця між сортами достовірна при $p \leq 0,05$.

Аналіз стадії тетрад показав, що у всіх проаналізованих сортів з різною частотою присутні в основному тетради з мікроядрами та з меншою частотою тетради з відсутніми 1–2 мікроспорами (рис. 7.59 ж, з), (табл. 7.20).

Інші типи порушень, а саме – утворення поліад виявили лише у трьох сортів – ‘Миронівська 61’, ‘Миронівська 65’ – носіїв транслокації 1BL.1RS та одного сорту з транслокацією 1AL.1RS (сорт ‘Золотоколоса’) спостерігали появу незначної кількості мультивалентів (0,49, 0,27 та 0,38 %), відповідно. Це, вірогідно, може свідчити про наявність у цих сортів дрібних хромосомних транслокацій.

Тетради з мікроядрами у сортів з транслокацією 1AL.1RS зустрічалися з різною частотою. Найменшу кількість таких клітин – 6,8 % спостерігали у сорту ‘Золотоколоса’, найбільшу – 12,8 % у сорту ‘Спасівка’. Клітин з відсутніми мікроспорами також найменше спостерігали у сорту ‘Золотоколоса’ (0,6 %), у трьох інших сортів вона була на рівні 2–4 %. У сортів з транслокацією 1BL.1RS частота клітин з мікроядрами коливалася від 6,3 % (сорт ‘Фаворитка’) до 12,5 % (сорт ‘Новокиївська’).

Таблиця 7.20

Порушення мейозу на стадії Т2

Сорт	Вивчено клітин, шт	Клітин з порушеннями, %	З мікроядрами, %	Без'ядерні, %	Інші, %	МІ
Одеська 267	995	$0,5 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,5$	-	-	$99,5 \pm 0,1$
Сорти з транслокацією 1BL.1RS						
Миронів. 61	1026	$8,8 \pm 0,9^*$	$7,3 \pm 0,8^{*a}$	$1,0 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,2$	$91,2 \pm 0,9$
Миронів. 65	1124	$9,3 \pm 0,9^*$	$6,5 \pm 0,7^{*b}$	$2,6 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,1$	$90,6 \pm 0,9$
Фаворитка	1017	$8,0 \pm 0,8^*$	$6,3 \pm 0,7^{*c}$	$1,7 \pm 0,4$	-	$92,0 \pm 0,9$
Новокиївська	1018	$15,4 \pm 1,1^*$	$12,5 \pm 1,0^{*a,b,c}$	$2,9 \pm 0,5$	-	$84,6 \pm 1,0$
Сорти з транслокацією 1AL.1RS						
Золотоколоса	1135	$7,8 \pm 0,8^*$	$6,8 \pm 0,7$	$0,6 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$	$92,2 \pm 0,8$
Княгиня Ольга	1018	$9,2 \pm 0,9^*$	$6,9 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,6$	-	$90,8 \pm 0,9$
Полянка	1059	$12,4 \pm 1,0^*$	$8,5 \pm 0,8$	$3,9 \pm 0,5$	-	$87,6 \pm 1,2$
Спасівка	921	$16,6 \pm 1,2^*$	$12,8 \pm 1,1$	$3,8 \pm 0,6$	-	$83,4 \pm 1,2$

Примітки: *Різниця між сортами достовірна при $p \leq 0,05$; до інших порушень віднесено наявність пентад, інш. поліад, тетради з різними за розміром мікроядрами тощо.

Кількість клітин з відсутніми мікроспорами у всіх сортів не перевищувала 4 %. Слід зазначити, що крім описаних порушень у сорту 'Спасівка' спостерігали пиляки, в клітинах яких відбувалося злипання (клампінг) хромосом (рис. 7.59 е). В метафазі мейозу 1 надконденсовані хромосоми тісно зближені і в них неможливо розрізнити окремі з них. В анафазі вони розтягуються і до полюсів відходить різна кількість хроматину, в результаті чого мікроспори, що утворюються в кінці мейозу розрізняються за розміром клітин і можуть бути стерильними.

Дослідження показників мейотичного індексу (який є чітким показником як нормального проходження мейозу, так і показником рівня цитологічної стабільності) показало, що сорти 'Миронівська 61', 'Миронівська 65', 'Фаворитка' (з транслокацією 1BL.1RS), а також сорти 'Золотоколоса', 'Княгиня Ольга', 'Полянка' (з транслокацією 1AL.1RS) мають високий мейотичний індекс ($> 85\%$), який притаманний цитологічно стабільним формам з нормальним перебігом мейозу та формуванням тетрад без порушень, що в подальшому обумовлює утворення життєздатного пилку. Сорти 'Новокиївська' та 'Спасівка', що мають дещо знижений мейотичний індекс, також цитологічно стабільні, але мають певну кількість порушень в

метафазі. Низький мейотичний індекс ($< 80 \%$) вказує на підвищений рівень порушень на цих стадіях і є показником нестабільності таких сортів, оскільки в них ще відбувається формоутворювальний процес (Лапочкина и др., 2014).

Підсумовуючи, слід зазначити, що вивчення характеру кон'югації хромосом у метафазі I мейозу досліджених сортів засвідчив присутність в їх геномах чужорідного генетичного матеріалу, який може бути представлений як транслокаціями, так і заміщеннями. Цитологічно показано, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- розроблено дев'ять систем на основі IRAP, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур. Досліджено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами та показано рівень генетичної відмінності між вивченими сортами цих видів. Виявлена висока ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону Sukkula як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів Wilma07 і Nikita у дослідженнях геному ячменю;
- встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10 для яких відсоток виявленого поліморфізму становить 50 % та 23,07 %, відповідно;
- здійснено хімічний мутагенез тритикале для відбору рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*. Проведено молекулярне дослідження мутантних рослин з використанням IRAP-маркерів, в результаті якого підтверджено зміни у геномі тритикале під дією мутагенів;
- розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінантні

молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі і обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для *Xgwm508* = $2,94 \pm 1,28 \%$, *Xgwm193* = $3,96 \pm 1,51 \%$, *Xgwm626* = $2,98 \pm 1,29 \%$, *Xgwm219* = $6,77 \pm 2,08 \%$;

- аналіз рослин пшениці F₄ і F₅ поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS виявив, що присутність гена *Gpc-B1* зумовлює статистично достовірне підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію. Комплексний аналіз вимірювання вмісту загального білка зернівок у рослин F₅ покоління методом К'єльдаля та NIR показав, що ген *Gpc-B1* зумовлює підвищення вмісту білка на 14 % у порівнянні з вихідним сортом 'Куяльник'. В цілому, виконані комплексні дослідження генетичних ефектів гена *Gpc-B1*, інтродукованого з *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці, у яких поліпшена якість зерна. Застосована біотехнологія маркер-допоміжної селекції забезпечила створення новітнього селекційного матеріалу пшениці з підвищеним вмістом білка та корисних мікроелементів у зерні у поєднанні з високими господарсько цінними властивостями рослин;
- проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* методом ПЛР. Здійснена оцінка 44 гібридних сімей F₅ покоління, носіїв гена *Gpc-B1*, на наявність алельних субодиниць генів *Glu-1* запасних білків. За трьома локусами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16 найбільш цінних сімей, які мають оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення;

- методом ПЛР визначено алельний склад генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які відповідають за твердозерність. Серед дослідженої вибірки сортів та гібридів пшениці ген *Pina-D1* не виявив поліморфності. У багатофакторному дисперсійному аналізі впливу різних алелів генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на твердозерність селекційних гібридів пшениці було виявлено спільний вплив ($p < 0,01$) комбінацій алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*. Проте детальніший однофакторний дисперсійний аналіз саме цих комбінацій на тих же даних не дає можливості однозначно підтвердити такий вплив ($p < 0,1$). На відміну від селекційних гібридів, де було показано сильний вплив ($p < 0,001$) на твердозерність наявності тих чи інших алелів гена *Pinb-D1*, у комерційних сортів української селекції такого впливу виявлено не було, що свідчить про те, що імовірно дія гена *Pinb-D1* залежить від генетичного оточення;
- створено та використано маркерну систему для визначення перенесення модифікованого локусу із геном *SBEIIa*, який викликає збільшення накопичення амілози в зерні. Відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки;
- за допомогою системи ДНК-маркерів визначено алельний склад генів *Psy1*, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні злакових культур у 162 сортів та гібридів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції. Серед дослідженої вибірки було відібрано зразки пшениці, у яких можна очікувати найвищу концентрацію каротиноїдів;
- показано, що використання молекулярно-генетичних маркерів може бути ефективним для аналізу геномів пшениці на наявність алелів генів *PPO*, що відповідають за активність поліфенолоксидази;
- встановлено, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Показано, що комплексне використання

двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації;

- на підставі цитогенетичного аналізу встановлено, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

Публікації пошукача, видані за даним розділом:

1. Лялько І.І., Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, 2018. Аналіз мейозу в сортів пшениці озимої м'якої - носіїв пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 16(2), с. 174–182.
2. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Поліщук С.С., 2018. *Gpc-B1 (NAM-B1)* ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка в зерні та мікроелементів. *Физиология растений и генетика*, 50(4), С. 279–298.
3. Stepanenko O.V., Stepanenko A.I., Kuzminskiy Ye.V., **Morgun B.V.**, 2017. Identification of *Psy1* genes alleles responsible for carotenoid accumulation in wheat grains. *Biotechnologia Acta*, 10(2), P. 57-66.
4. Михальська Л.М., Похилько С.Ю., Швартау В.В., Дуган О.М., **Моргун Б.В.**, 2017. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Біологічні студії / Studia Biologica*, 11(3–4), С. 34–35.
5. **Моргун Б.В.**, Похилько С.Ю., Починок В.М., Дуплій В.П., Дуган О.М., Христан О.О., Степаненко А.І., 2017. Генетичне різноманіття пуроіндолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* із *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Физиология растений и генетика*, 49(3), С. 229-236.
6. Похилько С.Ю., Степаненко А.І., Дуган О.М., **Моргун Б.В.**, 2017. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 21, С. 168-173.

7. Похилько С.Ю., Швартау В.В., Починок В.М., Михальська Л.М., Дуган О.М., **Моргун Б.В.**, 2017. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 15(1), С. 52–57.
8. Lakhneko O.R., Stepanenko A.I., **Morgun B.V.**, 2016. Genotyping *Triticum aestivum* L. cultivars of Ukraine with microsatellite markers. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 19, С. 61-63.
9. **Morgun B.V.**, Stepanenko A.I., Stepanenko O.V., Bannikova M.O., Holubenko A.V., Nitovska I.O., Maystrov P.D., Grodzinsky D.M., 2016. Implementation of molecular systems for identification of genetic polymorphism in winter wheat to obtain high-performance specialized varieties. *Science and Innovation*, 12(2): 40-56.
10. Pokhylko S.Yu., Schwartau V.V., Mykhalska L.M., Dugan O.M., **Morgun B.V.**, 2016. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Biotechnologia Acta*, 9(5), P. 64–69.
11. Polishchuk S.S., Kyrdohlo E.K., Mykhalska L.M., **Morgun B.V.**, Pokhylko S.Yu., Rybalka O.I., Schwartau V.V., 2016. Quantification of trace elements Fe, Zn, Mn, Se in barley grain. *Agricultural Science and Practice*, 3(1), P. 49-54.
12. **Моргун Б.В.**, 2016. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*, 48(4), С. 324–343.
13. **Моргун Б.В.**, Лялько І.І., Степаненко А.І., Бавол А.В., Великожон Л.Г., 2016. Цитологічна та молекулярно-генетична характеристика сортів озимої м'якої пшениці, отриманих за інтрогресивної селекції та мутагенезу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. Т. 19, С. 167–171.
14. Похилько С.Ю., Трояновська А.В., Степаненко А.І., Урбанович О.Ю., Дуган О.М., Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, 2016. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 18, С. 132-136.
15. Степаненко Е.В., Степаненко А.И., **Моргун Б.В.**, Рыбалка А.И., Кузьминский Е.В., 2016. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. *Вестник «ЮКГФА»* (Республиканский научный журнал «Вестник Южно-Казахстанской

государственной фармацевтической академии». – Республика Казахстан, г. Шымкент. № 4(77), С. 29-31.

16. **Моргун Б.В.**, Степаненко О.В., Степаненко А.І., Рибалка О.І., 2015. Молекулярно-генетична ідентифікація поліморфізму генів *Wx* у гібридах м'якої пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій. *Физиология растений и генетика*, 47(1), С. 25-35.

17. Степаненко А.І., Степаненко О.В., **Моргун Б.В.**, 2015. Поліморфізм генів пшениці, які визначають якісні ознаки, у харчових продуктах. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 16, С. 161-165.

18. **Моргун Б.В.**, Степаненко А.І., Чугункова Т.В., Лялько І.І., Степаненко О.В., Великожон Л.Г., 2014. Молекулярне визначення локалізації житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика. *Физиология растений и генетика*, 45(4), С. 319-324.

19. **Моргун Б.В.**, Чугункова Т.В., Лялько І.І., Великожон Л.Г., Степаненко А.І., 2014. Молекулярно-генетична ідентифікація та цитологічні особливості сортів озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 15, С. 220-223.

20. Степаненко А.І., Благодарова О.М., **Моргун Б.В.**, Чугункова Т.В., Рибалка О.І., 2014. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 12(1), С. 78-83.

21. Степаненко А.І., **Моргун Б.В.**, Трояновська А.В., Рибалка О.І., Великожон Л.Г., 2014. Алельні варіанти генів поліфенолоксидази PPO-A1 та PPO-D1 у сортів озимої пшениці української селекції. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 15, С. 238-242.

22. Степаненко А.І., Трояновська А.В., **Моргун Б.В.**, Чугункова Т.В., Великожон Л.Г., Рибалка О.І., Поліщук С.С., 2014. Маркерний аналіз генів поліфенолоксидази (PPO) у сортах м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*, 45(6), С. 490-497.

23. **Моргун Б.В.**, Чугункова Т.В., Рибалка О.І., Починок В.М., Тарасюк О.І., Степаненко А.І., 2013. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці. *Физиология растений и генетика*, 45(4), С. 290-295.

24. Степаненко О.В., Степаненко А.І., **Моргун Б.В.**, 2013. Молекулярно-генетичні методи ідентифікації алельних варіантів генів *Wx* у лініях м'якої пшениці за допомогою кодомінантних молекулярних маркерів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, Т. 12, С. 309-313.
25. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М., 2012. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків. *Физиология и биохимия культурных растений*, 44(1), С. 3–22.
26. Степаненко А.І., **Моргун Б.В.**, Чугункова Т.В., Адаменко Н.І., Великожон Л.Г., 2012. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 10(2), С. 311-318.
27. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М., 2011. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів. *Физиология и биохимия культурных растений*, 43(6), С. 463-477.
28. Ларченко К.А., **Моргун Б.В.**, 2010. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення. *Физиология и биохимия культурных растений*, 42(6), С. 463–474.
29. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Поліщук С.С. Ячмінь як продукт функціонального харчування. К.: Логос, 2016. – 670 с.

РОЗДІЛ 8

ПРИКЛАДНІ РЕЗУЛЬТАТИ СТВОРЕННЯ ВИХІДНОГО МАТЕРІАЛУ ТА СОРТІВ ЗЛАКОВИХ КУЛЬТУР

Практична придатність розроблених ДНК-технологій для добору та генотипування найбільш поширених в Україні зернових культур була перевірена шляхом їх впровадження у селекційний процес та отримання нового вихідного матеріалу злакових культур, зокрема озимої пшениці. Залучення маркер-допоміжної селекції у процес створення нових сортів дозволило нам проаналізувати сотні селекційних номерів пшениці на наявність пшенично-житніх транслокацій та генів, що детермінують господарсько-корисні ознаки, і відібрати найбільш перспективні генотипи для подальшої роботи. На основі практичного застосування маркер-допоміжної селекції створено та включено до Державних реєстрів рослин України, Російської Федерації та Молдови 31 сорт-інновація озимої пшениці. Новизна даних сортів підтверджена авторськими свідоцтвами цих країн.

У результаті плідної творчої співпраці між фахівцями Інституту фізіології рослин і генетики НАН України, Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України закладені наукові підвалини і теоретично обґрунтовані докорінно нові для України напрями селекції озимої пшениці, озимого і ярого ячменю (харчового голозерного) та озимого тритикале (Моргун та ін., 2021).

Ресурс такого потужного джерела генетичної плазми, як віддалена гібридизація, ще далеко не вичерпаний. Прикладом може бути пшениця, де інтрогресія в культуру генетичного різноманіття віддалених видів триває вже не одне десятиліття, та й досі дикорослі злаки залишаються важливим джерелом агрономічно цінних генів для поліпшення нових сортів культури.

До сьогодні для створення нового селекційного матеріалу пшениці в провідних селекційних центрах світу найбільш активно використовується

генетичне різноманіття дикорослого егілопсу *Ae. tauschii* (DD, $2n=2x=14$), який є донором ключового геному D культурної гексаплоїдної пшениці *T. aestivum* L., що відповідає за найважливіші агрономічні характеристики пшениці такі як урожайність, якість зерна, стійкість до хвороб та стресових чинників довкілля. Найбільш ефективним шляхом інтрогресії в культуру генетичної плазми *Ae. tauschii* є використання у схрещуваннях з культурною пшеницею штучно створених гексаплоїдних синтетиків з геномною формулою AABBDD ($2n=6x=42$), у яких геноми A і B походять від твердої пшениці чи дикорослої двозернянки, а геном D – від егілопсу *Ae. tauschii*. Доведено, що гексаплоїдні синтетики є потужним джерелом поліпшення культурної пшениці за комплексом агрономічних ознак, таких як зернова продуктивність, стійкість до біотичних і абіотичних чинників, і є чи не єдиним джерелом поліпшення культурної пшениці за такою стратегічно важливою ознакою, як посухостійкість (Сох, 2017; Gorafi et al., 2018).

У програмі створення оригінального селекційного матеріалу пшениці використано у схрещуваннях з культурною пшеницею два головних донори геному D пшениці: егілопси – ендемічний *Ae. cylindrica* (CCDD, $2n=4x=28$) та *Ae. tauschii*, останній у формі гексаплоїдних синтетиків (рис. 8.1).

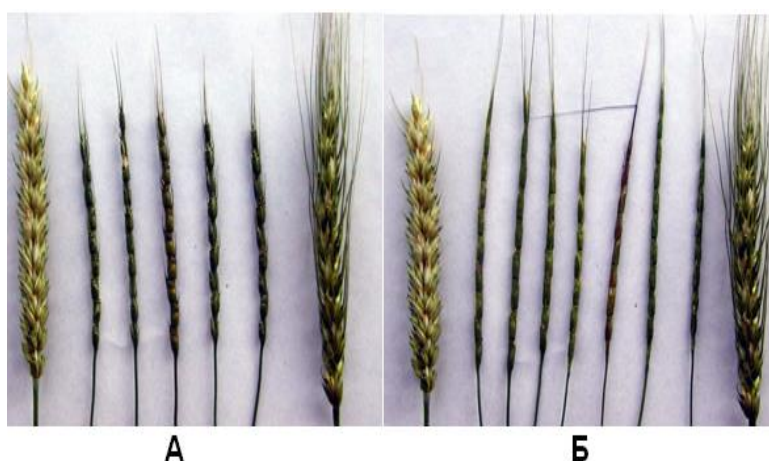


Рис. 8.1. Зразки колосів дикорослих видів-донорів ключового геному D м'якої пшениці: А) *Aegilops tauschii* (DD, $2n=2x=14$); Б) *Aegilops cylindrica* (CCDD, $2n=4x=28$).

Використовуючи дикорослі егілопси-донори геному D у схрещуваннях з культурною пшеницею, отримано інтрогресивні селекційні лінії пшениці з

екзотичними *Gli/Glu* алелями, урожаєм на рівні 10 т/га, відмінною хлібопекарською якістю зерна, стійкістю до хвороб та високою посухостійкістю. Перспективні селекційні лінії, похідні від віддалених схрещувань, були передані до державного сорто випробування, і в результаті два сорти озимої пшениці ‘Аміна’ і ‘Джамала’, придатні до розповсюдження на півдні, були занесені до Державного реєстру сортів рослин України.

Від схрещувань з *Ae. tauschii* в геном пшениці перенесено унікальний чужинний алель гена *Ha(ts)*, що детермінує екстраекспресію білків крохмальних гранул фріабілінів і, відповідно, екстрам’який тип консистенції ендосперму пшениці (рис. 8.2).

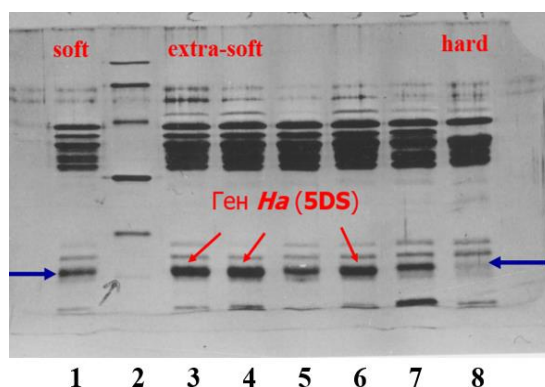


Рис. 8.2. Інтрогресія в геном пшениці від дикорослого егілопсу: стрілками позначені білки крохмальних гранул, що кодуються алелем *Ha(ts)* з екстраекспресією (3, 4, 6), інтрогресованим у пшеницю від егілопсу *Ae. tauschii*.

Алель гена *Ha(ts)* є унікальним і не зустрічається у жодного із відомих сортів пшениці. Він фенотипічно проявляється у формі екстрам’якозерної консистенції ендосперму (*extra-soft*), а на електрофореграмі (рис. 8.2) у вигляді інтенсивно вираженої смуги (зразки 3, 4, 6) з дещо вищою електрофоретичною рухомістю порівняно з таким самим білком, характерним для м’якозерної пшениці (*soft*). Інтрогресований від егілопсу *Ae. tauschii* алель *Ha(ts)* став генетичною основою для створення нового для України класу сортів пшениці (*extra-soft*) з екстрам’яким ендоспермом бісквітного (кондитерського) напрямку використання (Моргун та ін., 2021).

Для селекції сортів хлібопекарської пшениці з генетично детермінованою високою і екстрависокою хлібопекарською якістю особливо цінними є гени із сильними позитивними ефектами на цю ознаку. Для створення таких сортів створено цілий ряд ліній з оригінальними алелями *Gli/Glu*-локусів із сильним позитивним впливом на реологічні властивості тіста. Так, від егілопсів *Ae. tauschii* та *Ae. cylindrica* в геном пшениці були інтрогресовані відповідно два алеля *Gli-D1ts* і *Gli-D1cyl* з позитивним ефектом на реологію тіста, вищим, ніж в інших алелів локусу *Gli-D1*, що розповсюджені серед сортів пшениці української селекції. Алелі *Gli-D1ts* і *Gli-D1cyl* є також оригінальними і не зустрічаються у сортів пшениці української селекції. У наших дослідках спостерігали помітний ефект обох алелів *Gli-D1ts* і *Gli-D1cyl* у підвищенні ознаки твердості зерна, частка впливу кожного з яких становила вище 15 %.

Також у селекційних програмах було використано три унікальні алелі локусу *Glu-1*, що кодує біосинтез високомолекулярних (ВМ) глютенінів: 1) алель *Glu-B1al(77+8)* (з екстраекспресією субодиниці 7 високомолекулярних глютенінів), який виник в результаті спонтанної тандемної дуплікації гена, що контролює біосинтез субодиниці 7; 2) алель *Glu-D1x5* зі штучно індукованою екстраекспресією субодиниці 5 високомолекулярних глютенінів; 3) алель *Glu-A1x2** зі штучно індукованою екстраекспресією субодиниці 2* високомолекулярних глютенінів.

Всі ці три алелі локалізовані у довгих плечах різних хромосом гомеологічної групи 1 (1B, 1D і 1A), успадковуються незалежно, легко детектуються за допомогою відповідних молекулярних маркерів, і комбінуються в одному генотипі, що дозволяє створювати селекційний матеріал пшениці із запрограмованою екстрависокою хлібопекарською якістю борошна (рис. 8.3).

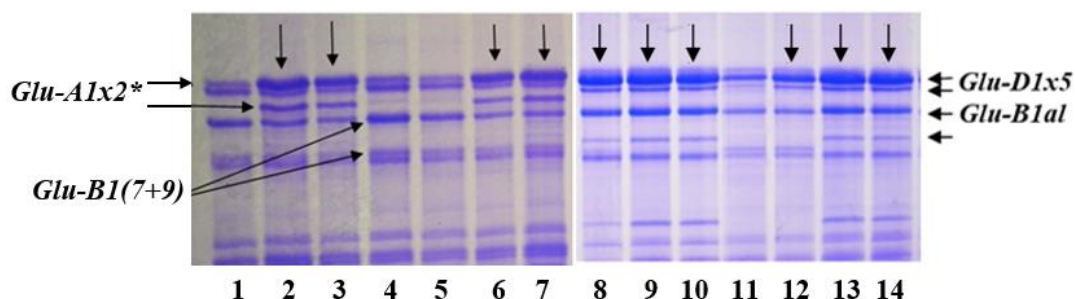


Рис. 8.3. Електрофореграми міні-SDS-електрофорезу ВМ-глютенінів селекційних ліній пшениці з екстраекспресією субодиниці *Glu-A1x2** (2, 3, 6, 7) та субодиниці *Glu-D1x5* (8–14). Алель *Glu-B1al* (8–10, 13, 14).

У табл. 8.1 наведені дані дослідження ефектів екстраекспресії алелів *Glu-D1x5* та *Glu-A1x2** на урожай і показники його якості у константних селекційних ліній пшениці >F₇.

З наведених у табл. 8.1 даних можна бачити, що лінії з екстраекспресією обох субодиниць *Glu-D1x5* та *Glu-A1x2** мали в середньому краще виповнене зерно, ніж сорт ‘Куяльник’. За вмістом білка в зерні обидва варіанти екстраекспресії субодиниць *Glu-D1x5* та *Glu-A1x2** достовірно переважали сорт ‘Куяльник’, особливо виділялися лінії з екстраекспресією субодиниці *Glu-A1x2** які за середнім значенням вмісту білка в зерні 13,0 % істотно переважали сорт ‘Куяльник’ за середнього значення вмісту білка в його зерні 10,7 %.

Особливо помітний сильний ефект екстраекспресії обох субодиниць *Glu-D1x5* та *Glu-A1x2** на ознаку твердості зерна. Лінії з екстраекспресією *Glu-D1x5* у середньому майже вдвічі (58 проти 32) переважали сорт ‘Куяльник’ за твердістю зерна. Сильний ефект екстраекспресії субодиниці *Glu-A1x2** проявився на показник седиментації борошна SDS-30K, в середньому, на 22 мл перевищивши середнє значення 70 мл седиментації для сорту ‘Куяльник’. Разом з тим, ефект екстраекспресії субодиниці *Glu-D1x5* проявився негативно на показнику SDS-30K седиментації, достовірно знизивши його, в середньому, на 17 мл порівняно зі значенням седиментації борошна сорту ‘Куяльник’ (53 мл проти 70 мл).

Таблиця 8.1

Вплив екстра-експресії алелів *Glu-D1x5* та *Glu-A1x2 на урожай і характеристики якості зерна озимої пшениці (2018 р.)**

№ зразка	Походження	Маса зерна з 1 м ряду, г	Виповне- ність зерна, бал	Вміст протеїну у зерні, %	Твердіст ь зерна Inframati с 8611	Седиментац ія борошна SDS-30K, мл
Контроль						
804/69	Куяльник	264	3,8	10,3	34	61
808/70	Куяльник	302	4,0	9,8	30	68
818/71	Куяльник	293	3,8	11,4	32	74
822/69	Куяльник	297	3,8	10,5	24	64
827/70	Куяльник	330	4,0	11,1	35	80
827/71	Куяльник	279	4,0	11,0	35	74
Середнє		294	3,9	10,7	32	70
<i>Glu-D1x5</i> (***)						
823/52	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	277	4,0	11,7	53	53
823/55	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	218	4,0	12,5	58	51
823/57	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	265	4,0	12,3	69	53
823/68	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	272	4,3	11,2	61	50
823/73	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	241	4,3	10,5	56	54
823/74	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	284	3,8	11,6	57	53
823/75	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	215	4,3	12,1	62	54
823/79	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	300	4,0	11,6	53	52
823/81	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	219	4,3	11,2	55	52
823/90	F ₇ , Кул х <i>Glu-D1x5</i> (***)	257	4,3	12,6	55	58
Середнє		255	4,1	11,7	58	53
t факт		2,98*	3,08**	3,28**	11,28**	5,76**
t табл 05 – 2,15						
t табл 01 – 2,98						
<i>Glu-A1x2*</i> (***)						
823/112	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	213	4,3	13,2	46	92
823/114	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	194	4,3	10,9	37	84
823/115	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	262	3,8	13,9	57	92
823/118	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	256	4,0	13,6	50	93
823/121	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	251	3,8	12,3	52	91
823/122	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	330	4,3	13,0	41	94
823/124	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	288	4,0	14,2	49	94
823/125	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	263	3,8	13,3	58	92
823/130	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	342	4,0	13,4	46	94
823/132	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	366	4,3	12,9	55	93
823/133	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	304	4,0	13,5	35	94
823/136	F ₇ , Кул х <i>Glu-A1x2*</i> (***)	357	4,3	12,2	52	92
Середнє		286	4,1	13,0	48	92
t факт		0,47	2,30*	6,67**	5,97**	7,28**
t табл 05 – 2,12						
t табл 01 – 2,92						

Негативний ефект екстраекспресії субдиниці *Glu-D1x5* на показник седиментації може бути пояснений тим, що екстрадоза субдиниці *Glu-D1x5* призводить до надлишкової кількості у клейковині міжмолекулярних -S-S- зв'язків, які надають клейковині незвичайно високу пружність, що й проявляється в істотному підвищенні твердості зерна і відповідно зниженні

значення SDS-30K седиментації, яка чітко реагує на підвищений розмір часток борошна при помелі зерна з високою твердістю.

Таблиця 8.2

Транслокаційні лінії озимої пшениці з різною якістю борошна

№ п/ч	Назва	Походження	Седиментація SDS-30
1AL.1RS			
1	Ук 3085А	Херсонська б/о × Смуглянка	56
2	Ук 2813	Херсонська б/о × Смуглянка	60
3	Ук 710	Херсонська б/о × Смуглянка	80
4	Ук 715	Херсонська б/о × Смуглянка	83
5	Ук 1379	Херсонська б/о × Смуглянка	85
6	Херсонська б/о	Вихідна форма	80
1BL.1RS			
7	Ук 1329	Ук 304 × Куяльник – <i>Glu-B1al</i>	70
8	Ук 2713/11	Ук 304 × Куяльник – <i>Glu-B1al</i>	72
9	Ук 8402/10	Ук 304 × Куяльник – <i>Glu-B1al</i>	76
10	Ук 976	Ук 304 × Куяльник – <i>Glu-B1al</i>	88
11	Ук 8402/10	Ук 304 × Куяльник + <i>Glu-B1al</i>	89
12	Ук 697А	Ук 304 × Куяльник – <i>Glu-B1al</i>	93
13	Ук 304	Вихідна форма	79
14	Куяльник	Вихідна форма	93
1AL.1RS			
15	Ук 683	Смуглянка × Куяльник	75
16	Ук 2725/11	Смуглянка × Куяльник	70
17	Ук 3436	Смуглянка × RBB	41
18	Ук 1644/11	Buster × Смуглянка	53
19	Ук 1672/11	Palotas × Смуглянка	44
20	Смуглянка	Вихідна форма	65
21	RBB	Вихідна форма	29
22	Buster	Вихідна форма	37
23	Palotas	Вихідна форма	41

У світовій селекції пшениці, а також в Україні, широко використовується центрична житньо-пшенична хромосомна транслокація у двох варіантах 1RS.1BL та 1RS.1AL, яка несе комплекс генів стійкості до хвороб (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9*, *Pm8*) та чинить позитивний вплив на урожай зерна (Howell et al., 2014). Однак, житній локус *Sec-1* у короткому плечі хромосоми жита 1RS різко знижує хлібопекарську якість борошна. Нами, спільно із селекціонерами, проведені об'ємні дослідження стосовно вивчення можливостей модифікації негативного прояву транслокацій на якість

борошна (табл. 8.2). За нашими даними більший негативний вплив на якість борошна має транслокація 1AL.1RS, хоча інші автори віддають перевагу транслокації 1BL.1RS. Суть в тому, що із двох вивчених транслокацій, їх вплив на якість борошна залежав від генотипу, в якому вони знаходились. Варіювання впливу однієї і тієї ж транслокації в різних генотипах на якість борошна становило від 54 до 80 одиниць седиментації (табл. 8.2).

Комбінація транслокації з алелем *Glu-B1a1* (сильного впливу на якість борошна), чи схрещування її з сортом з високоякісним зерном істотно послаблює негативний вплив транслокації на зниження якості борошна, що дозволяє, в разі спрямованого добору, отримувати транслокаційні лінії з хорошою якістю борошна (Ук 715, Ук 710, Ук 1379, Ук 8402/10, Ук 976, Ук 697А).

При цьому транслокаційні сестринські лінії (Ук 8402/10) з алелем *Glu-B1a1* і без нього мали істотну різницю за показниками седиментації (89 і 76 відповідно). Схрещування транслокаційної лінії з формою, яка має низьку якість борошна, дає адитивний ефект, а відібрані в наступних гібридних поколіннях (F_2 – F_4) транслокаційні лінії мають навіть нижчі показники седиментації, ніж вихідна транслокаційна лінія (Ук 3436, Ук 1644/11, Ук 1672/11). Нами встановлено тісний кореляційний зв'язок пшенично-житньої транслокації із зменшенням якості борошна за показниками седиментації приладу SDS-30. Низькі значення седиментації за приладом SDS-30 з великою вірогідністю засвідчують про наявність у певній лінії транслокації. Дану залежність ми рекомендуємо використовувати в селекції з метою експрес-добору ліній з наявністю чи відсутністю пшенично-житньої транслокації.

З метою елімінації негативного впливу транслокацій 1RS.1BL та 1RS.1AL на хлібопекарську якість борошна отримано хромосомно-інженерну модифікацію транслокації 1RS.1BL (створену проф. А. Лукашевським, California University, Riverside, USA), у якій житній, негативний щодо хлібопекарської якості локус *Sec-1*, заміщений на позитивний для якості

пшеничний локус *Gli-B1*, а інші селекційно-позитивні ефекти збережені. На основі цієї модифікації нами цілеспрямовано отримана рекомбінантна лінія пшениці, у якої в довгому плечі хромосоми 1BL алель *Glu-B1(17+18)* замінений на алель *Glu-B1a1* з сильним позитивним впливом на хлібопекарські властивості борошна. Отримана рекомбінантна лінія з модифікованою транслокацією 1RSm.1BL *Glu-B1(77+8)* активно використовується у селекційних програмах для поліпшення хлібопекарської якості сортів пшениці з транслокаціями 1RS.1BL та 1RS.1AL (рис. 8.4).



Рис. 8.4. Об'єм хліба з борошна селекційної лінії пшениці з модифікованою пшенично-житньою транслокацією 1RSm.1BL порівняно із селекційною лінією з оригінальною 1RS.1BL транслокацією.

В Україні найбільші посівні площі у виробництві займають сорти, створені з використанням транслокацій. У 2014–2015 рр. їх частка від загальної площі посіву сортів озимої пшениці селекції ІФРГ НАН України в 1 млн. 799 тис. га становила 62,7 % (табл. 8.3).

Сорти озимої пшениці з пшенично-житніми транслокаціями мають високу екологічну пластичність, підвищену стійкість до хвороб і шкідників та інших несприятливих чинників довкілля. Вони характеризуються ремонтантним станом пагонів, коли колос дозріває, а листки залишаються зеленими, продовжуючи продукувати фотосинтетичні продукти. Високу оцінку у виробництві отримали сорти з пшенично-житньою транслокацією 1AL.1RS, які зайняли в Україні найбільшу посівну площу у 2014–2015 рр. – 444,3 тис. га.

Таблиця 8.3

Посівні площі в Україні (2014–2015 рр.) сортів озимої пшениці селекції ІФРГ НАН України, створених з використанням пшенично-житніх транслокацій*

№ п/ч	Сорти	Посівна площа	
		гектари	%
1	Без транслокацій	401 929	37,2
2	3 транслокацією 1AL.1RS	444 282	41,2
3	3 транслокацією 1BL.1RS	233 729	21,6
Всього		1 079 940	100,0

Примітка: *Сума посівних площ 10 сортів у кожній групі, які займали найбільші посівні площі.

При цьому сорти з різними транслокаціями мали відмінності у зональному розміщенні їхніх посівних площ. Посіви сортів із пшенично-житньою транслокацією 1AL.1RS переважно розміщувалися в Лісостеповій і Степовій зонах, а з транслокацією 1BL.1RS – відповідно у зонах Лісостепу і Полісся. В ході селекційних доборів у поколіннях F_2 – F_5 було встановлено, що добір на наявність у ліній транслокацій – це добір, значною мірою, на високу продуктивність.

Проведені нами багаторічні дослідження підтверджують дані про те, що пшенично-житні транслокації, які несуть комплекс генів стійкості до хвороб (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9*, *Pm8*), позитивно впливають на урожай сортів, які мають ці транслокації, та їх стійкість до хвороб.

Із використанням пшенично-житніх хромосомних транслокацій 1AL.1RS та 1BL.1RS створено серію сортів озимої пшениці: ‘Смуглянка’, ‘Золотоколоса’, ‘Фаворитка’, ‘Астарт’ та інші, які забезпечили отримання рекордних урожаїв зерна – 124–140 ц/га. Дані сорти успішно конкурують із зарубіжними аналогами і займають в Україні великі посівні площі. Вони мають комплексний імунітет до основних хвороб і придатні для вирощування в органічному землеробстві та на зрошуваних площах. Ми вважаємо, що транслокаційні сорти, які мають комплекс корисних ознак (‘Смуглянка’, ‘Золотоколоса’, ‘Сотниця’, ‘Борія’, ‘Фаворитка’ та ін.), варто залучати до

схрещування, оскільки в наступних поколіннях гібридів (F_2 – F_4) є можливість відібрати лінії як з транслокацією, так і без неї.

Сорти озимої пшениці з пшенично-житньою транслокацією мали істотні переваги за урожаєм зерна над сортами, які не містили транслокацій (табл. 8.4). За шість років конкурсного випробування, сорти з транслокаціями за урожайності 94,8–95,6 ц/га перевищили за продуктивністю звичайні сорти на 8,7–9,5 ц/га.

Таблиця 8.4

Середній урожай (2010–2015 рр.) у конкурсному випробуванні сортів озимої пшениці селекції ІФРГ НАН України, створених з використанням і без пшенично-житніх транслокацій*

№ п/ч	Сорти	Врожай	
		ц/га	± до стандарту
1	Без транслокацій (стандарт)	86,1	–
2	3 транслокацією 1AL.1RS	94,8	8,7
3	3 транслокацією 1BL.1RS	95,6	9,5

Примітка: *У кожній групі відібрано по 6 сортів, які за роками випробування мали найбільшу продуктивність.

Таким чином, спільно з селекціонерами Інституту фізіології рослин і генетики НАН України створені високопродуктивні сорти озимої пшениці, які містять пшенично-житні транслокації, займають в Україні значні посівні площі та мають хорошу і високу якість зерна (табл. 8.5). При належній технології дані сорти в масовому масштабі забезпечують агроформуванням України отримання зерна 2–3 класів якості.

Вміст білка у зерні є першим показником, що лімітує як харчові, так і технологічні характеристики зерна пшениці. Він є досить складною кількісною ознакою з чітко вираженою зворотною залежністю від рівня урожаю зерна, яка більшою мірою залежить від середовища та умов вирощування, ніж від генотипу, контролюється комплексом генів з адитивними і неадитивними ефектами, та важко досяжною для істотного поліпшення методами традиційної селекції.

Таблиця 8.5

**Господарсько-цінні сорти селекції ІФРГ НАН України, які є носіями
пшенично-житніх транслокацій**

№ п/ч	Сорт	Седиментація SDS-30
1AL.1RS		
1	Полянка	49
2	Колумбія	64
3	Спасівка	64
4	Смуглянка	65
5	Золотоколоса	65
6	Славна	66
7	Борія	68
8	Сотниця	70
Середнє		63,9
1BL.1RS		
9	Достаток	54
10	Астарта	58
11	Фаворитка	65
12	Новокиївська	70
13	Трипільська	73
14	Чигиринка	75
15	Володарка	79
16	Орійка	80
Середнє		69,3
Сорти-стандарти		
17	Подольянка	80
18	Одеська 267	86
19	Ятрань 60	90
20	Куяльник	93
Середнє		87,3

Ефективність гена *Grc-B1*, як фактора, що здатний істотно підвищити вміст у зерні пшениці білка і мікроелементів (без зниження урожаю), доведена в численних дослідженнях у різних країнах, і рекомендоване його широке використання в селекції (Distelfeld et al., 2006). Генетичний матеріал з геном *Grc-B1* успішно використано у селекційній програмі, спрямованій на підвищення вмісту в зерні пшениці білка та ключових мікроелементів (Степаненко та ін., 2014; Рибалка та ін., 2018).

Таблиця 8.6

Вплив гена *Gpc-B1* на урожай, вміст білка в зерні та технологічні характеристики зерна генотипів озимої пшениці, гомозиготних за цільовим геном *Gpc-B1*

№ зразка	Походження	Маса зерна з 1 м ряду, г	Виповненість зерна, бал	Вміст протеїну в зерні, %	Твердість зерна Inframati с 8611	Седиментація борошна SDS-30K, мл
<i>Gpc-B1</i>+						
824/35	F ₇ , <i>Gpc-B1</i> × Куяльник	257	3,0	13,9	42	93
825/25	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	292	3,3	13,4	34	92
825/29	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	217	2,8	14,3	35	91
825/46	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	283	3,8	12,6	28	93
826/38	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	211	3,0	14,1	38	92
826/42	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	250	3,8	12,5	21	93
826/45	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	225	2,8	14,4	1	96
82647	F ₄ , Кул* × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	223	2,8	13,5	10	95
827/38	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	271	3,8	12,5	12	88
827/40	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	234	3,8	12,7	19	88
827/41	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	271	3,3	13,0	20	93
828/41	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	315	3,8	12,8	17	91
828/42	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	249	3,0	12,9	18	87
828/45	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	279	2,8	13,2	9	86
828/47	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	293	3,3	12,9	13	90
828/48	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	298	3,0	13,5	6	94
Середнє		261	3,2	13,3	20	91
<i>Gpc-B1</i>–						
822/34	F ₄ , Кул × 425/1-49(<i>Gpc-B1</i>)	333	3,8	10,0	39	58
822/39	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	307	3,8	11,2	8	62
823/32	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	283	4,0	9,1	18	50
823/33	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	227	3,8	9,5	30	50
824/31	F ₇ , <i>Gpc-B1</i> × Куяльник	189	3,8	10,5	18	70
824/32	F ₇ , <i>Gpc-B1</i> × Куяльник	149	3,0	11,6	8	68
824/37	F ₇ , <i>Gpc-B1</i> × Куяльник	259	3,8	11,1	11	64
824/41	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	286	3,0	11,9	14	80
825/28	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	298	4,0	12,1	27	74
825/32	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	285	3,3	11,3	21	63
825/33	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	253	3,8	10,2	21	55
825/37	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	263	3,8	11,8	31	80
825/45	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	240	3,8	12,0	26	81
826/30	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	243	4,0	12,0	29	77
826/37	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	263	3,0	11,6	26	80
826/41	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	231	3,0	11,8	25	74
826/48	F ₄ , Кул × 26/122(F ₄ , <i>Gpc-B1</i> × Кул)	285	3,8	11,5	17	76
827/39	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	313	3,8	11,3	15	76
827/42	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	244	3,8	11,6	13	77
828/46	F ₄ , Кул × 635/76(<i>Gpc-B1</i>)	300	3,8	11,9	13	85
Середнє		263	3,6	11,2	21	70
t факт		0,16	2,96**	8,17**	0,09	8,56**
t табл 05 – 2,03						
t табл 01 – 2,73						

Примітка: Кул* – ‘Куяльник’.

Дані табл. 8.6 демонструють ефект гена *Gpc-B1* за вмістом білка в зерні у двох груп перспективних селекційних ліній пшениці, відібраних з різних комбінацій схрещування, в генотипі яких цей ген присутній (*Gpc-B1+*), або відсутній (*Gpc-B1-*).

Так, генотипи з геном *Gpc-B1+* порівняно з генотипами без нього *Gpc-B1-* мали вміст протеїну в зерні в середньому вище на 2,1 % і переважали останніх за індексом SDS-30K седиментації у середньому на 20 мл. Наразі отримані перспективні селекційні лінії з геном *Gpc-B1*, які не поступаються за урожаєм кращим сортам-стандартам, мають задовільну виповненість зерна і вміст білка на 1,5–2,0 % вище стандартів. Оскільки вміст білка в зерні є ознакою стратегічного значення для культури пшениці, ми вважаємо що ген *Gpc-B1*, як цільовий, має бути присутнім в усіх селекційних програмах в Україні зі створення сортів пшениці високої хлібопекарської якості, з високим вмістом у зерні білка і ключових мікроелементів.

Крохмаль пшениці є основним інгредієнтом хліба і хлібопродуктів. Крохмаль зернових культур становить 65–70 % маси зерна, складається із двох нерозчинних у воді гомоглюканів – 25–28 % амілози (лінійний полімер глюкози) та 72–75 % амілопектину (розгалужений полімер глюкози). Співвідношення компонентів крохмалю амілоза/амілопектин для всіх ключових зернових культур має стратегічно важливе як технологічне, так і харчове значення. Це співвідношення у гексаплоїдній пшениці регулюється генетично або шляхом підвищення вмісту амілози відносно амілопектину, або навпаки – зниженням до нуля вмісту амілози по відношенню до амілопектину.

Зниження вмісту амілози у крохмалі можна досягти шляхом часткового чи повного блокування функції ключового ферменту крохмальних гранул *GBSS*, що контролює біосинтез амілози. Біосинтез ферменту *GBSS* у пшениці кодують три гени *WxA1* (хромосома 7AS), *WxB1* (хромосома 4AL) та *WxD1* (хромосома 7DS). Рецесивний алель кожного з цих генів блокує біосинтез амілози. За наявності у генотипі трьох рецесивних алелів цих генів

синтезується крохмаль *ваксі* з нульовим, або мінімальним вмістом амілози (Моргун та ін., 2015). Комбінуючи в одному генотипі три рецесивні алелі генів *Wx-A1* (хромосома 7AS) *Wx-D1* (хромосома 7DS) і *Wx-B1* (хромосома 7AL), вперше в Україні створено пшеницю ваксі, у якої практично повністю відсутня амілоза у крохмалі. Пшениця ваксі має докорінно відмінні від традиційної пшениці технологічні властивості зерна: температура желатинізації крохмалю на 10 °C нижча, ніж у звичайної пшениці, число падіння у межах 60–70 с (норма 200–250 с), водопоглинальна спроможність борошна 70–75 % (норма 56–60 %). Тісто з пшениці ваксі витримує кілька циклів заморожування-розморожування. Хімічно модифікований крохмаль ваксі використовується для виготовлення харчових згущувачів. Пшениця ваксі розглядається як основа для створення сортів кормового використання, оскільки крохмаль цієї пшениці практично повністю, на відміну від звичайної, метаболізується у шлунково-кишковому тракті тварин, забезпечуючи їх високою метаболічно засвоюваною енергією. Також вона має перспективу використання у спирто-дистилятній промисловості.

Високоамілозна пшениця порівняно зі звичайною пшеницею має істотно поліпшений харчовий статус за рахунок підвищеного вмісту у зерні резистентного до ферментів шлунково-кишкового травлення крохмалю, подібного за властивостями до дієтичної клітковини. Завдяки цьому загальна біологічна цінність крохмалю, і в цілому зерна, радикально поліпшується внаслідок істотного (до 20–30 одиниць) зниження гліцемічного індексу (ГІ – швидкість зростання концентрації цукру у крові), як головного показника дієтичної цінності вуглеводистих харчових продуктів. Що менше ГІ, то нижчий рівень гліцемічного відгуку при вживанні таких продуктів, і нижче імовірність розвитку метаболічного синдрому та діабету 2 типу.

Підвищення вмісту амілози у крохмалі пшениці від норми 20–25 % до понад 70 % досягається шляхом використання щонайменше двох біотехнологічних процедур: а) технології РНК-інтерференції (RNAi) і блокування функції одного з ключових ферментів *SBEIIa*, відповідального за

гілкування амілопектину; або б) шляхом використання технології TILLING, утворення стоп-кодону у смисловій послідовності цільового *SBEIIa* гена та повного блокування його транскрипції. Контроль блокованого *SBEIIa* гена у селекційних популяціях пшениці здійснюється за допомогою ПЛР з використанням специфічних праймерів. Отримано перспективний селекційний матеріал, який досліджується за агрономічними характеристиками та вмістом амілози у крохмалі (Рибалка та ін., 2015).

Нами ініційована програма селекції сортів м'якої пшениці круп'яного напрямку використання (круп, пластівці), яка в Україні взагалі відсутня. Крупа із цільного зерна, на відміну від продуктів з білого борошна, це найефективніший спосіб використання харчового біологічного потенціалу цілого зерна, зосередженого головним чином у периферійних шарах зернівки. Важливо також наголосити, що пшениця для виробництва круп (пластівців) не потребує високого вмісту клейковини та відмінних хлібопекарських характеристик. Вона повинна мати високий вміст повноцінного розчинного білка, мікроелементів, вітамінів та підвищений вміст резистентного до ферментів травлення крохмалю, бути збалансованою за всіма біологічно цінними елементами зерна і мати не лише енергетичне, але й профілактично-лікувальне (функціональне) значення.

Генетичною основою для створення сортів пшениці круп'яного використання мають бути такі характеристики зерна, як його колір та консистенція ендосперму (твердість). Найбільш поширений серед сортів червоний колір зерна пшениці контролюється домінантними алелями від одного до трьох генів: *R-A1b* (хромосома 3AL), *R-B1b* (хромосома 3BL) та *R-D1b* (хромосома 3DL). На відміну від червонозерної пшениці білий колір зерна детермінується рецесивними алелями цих генів, і генотип білозерної пшениці має наступну генетичну формулу: *R-A1a; R-B1a; R-D1a*. Продукти із зерна білозерної пшениці, на відміну від червонозерної, мають м'який приємний смак без гіркоти, характерної для червонозерної пшениці. Нами вперше в Україні започаткований напрям селекції білозерної хлібопекарської

пшениці. Наразі вже створений перспективний матеріал білозерної твердозерної пшениці з високою хлібопекарською якістю.

Сьогодні на харчовому ринку в цілому ряді країн світу (Китай, Індія, Південна Корея, Австралія, Канада, США, Японія, Австрія, Чехія, та ін.) набирає обертів впровадження продуктів здорового харчування, створених на основі унікальних сортів пшениці і ячменю з кольоровим (чорним, синім, фіолетовим) зерном. Автори цих досліджень появу на ринку зернових злаків з кольоровим зерном називають «другою зеленою революцією» оскільки кольорове зерно, як засіб його біофортificaції, радикально поліпшує харчовий статус зерна і продуктів його переробки (Guo et al., 2012).

Різні кольори зерна (рис. 8.5) визначають пігменти антоціаніни і фітомеланіни. Це водорозчинні пігменти, що належать до сімейства флавоноїдів, які в свою чергу є частиною ще більшої групи біологічно активних сполук поліфенолів. Антоціаніни також відповідають за червоне, фіолетове, синє, помаранчеве та інші відтінки забарвлення різних рослинних органів, тканин, плодів. Колір ягоди чорниці чи лохини визначають практично ті ж самі антоціаніни, що присутні у фіолетовому чи чорному зерні пшениці чи ячменю. Згідно з результатами численних клінічних досліджень, харчові продукти, багаті на антоціаніни, вважаються такими, що забезпечують профілактику організму людини проти цілого комплексу патологій, таких як серцево-судинні хвороби, рак, діабет, гіпертонія, запалення органів, ожиріння, вони сприяють сповільненню старіння, захищають організм від руйнівного УФ-випромінювання (Andersen, 2006).



Рис. 8.5. Зразки зерна пшениці зліва направо: червоний, фіолетовий, білий і синій кольори (червоний і фіолетовий пігменти локалізовані в оболонці, а синій – в алеїроновому шарі зернівки).

Серед сортів культурної пшениці відсутні генотипи з кольоровим зерном. Найбільш відомими джерелами різного кольору зерна, які активно використовуються в селекції культурної пшениці, є такі дикорослі види як *Triticum boeoticum*, *T. monococcum*, *Agropyron glaucum*, *A. tricholophorum*, *A. elongatum*, *Secale cereale* та інші (Li et al., 2005).

Перенесені в геном пшениці хромосомні транслокації від пирію спричиняють появу фіолетового кольору зерна і пов'язане з ним підвищення вмісту у зерні вітамінів, цінних мінералів (в т. ч. селену) та рівня його загальної антиоксидантної активності. Це генетичне джерело (від донора, китайського сорту 'Donghei 10') ми використовуємо у селекційній програмі зі створення сортів пшениці з фіолетовим зерном круп'яного напрямку використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна.

На основі чужинних хромосомних транслокацій від пирію ми створюємо також чорнозерну пшеницю спельту круп'яного і хлібопекарського напрямку використання, яка у найближчі роки вперше з'явиться в Україні (рис. 8.6). Наша пшениця-спельта має темно-фіолетовий (практично чорний) колір зерна від сорту 'Чорноброва', і створена вона шляхом доборів типового морфотипу оригінальної дикорослої спельти у процесі п'яти перерваних бекросів на оригінальну спельту німецького походження.



Рис. 8.6. Чорнозерна пшениця-спельта, вперше створена в Україні.

Крім генів забарвлення зерна (пов'язаних з високою антиоксидантною активністю) для круп'яної пшениці важливе значення має твердість зерна, яка головним чином контролюється геном *Ha*, що локалізований у хромосомі 5DS (займає регіон ДНК 82 000 п.н. і містить три гени *Pin a*, *Pin b* та *Gsp-1*), та серією генів-модифікаторів. Рецесивний алель гена *Ha* детермінує високу твердість зерна, а домінантний – м'яке зерно. Висока твердість зерна потрібна для виготовлення крупи, і навпаки, низька твердість важлива для виробництва пластівців. Варіювання за ознакою твердості зерна на матеріалі наших дослідів спостерігалось у вельми широкому діапазоні значень інфрачервоного аналізатора Inframatic 8611 від негативного –62 (*extra-soft*) до позитивного +69 (*extra-hard*). Генетична система контролю твердості зерна, що використовується у наших дослідженнях, дає можливість отримати генотипи з будь-якими рівнями твердості в межах вказаного діапазону значень.

Важливим висновком із результатів досліджень технологічного значення твердості зерна пшениці впливає також чітко виражений загальний зворотний зв'язок між оцінками твердості зерна різних зразків пшениці і седиментацією SDS-30K, яка характеризує потенціал хлібопекарської якості (рис. 8.7). Мінімальні значення седиментації 30–35 мл були у зразків екстрам'якозерної пшениці зі значеннями твердості –58. Водночас, максимальні показники SDS-30K седиментації показали зразки пшениці з твердістю зерна +20. Практично всі досліджені зразки озимої пшениці із задовільними для хлібопекарської якості величинами SDS-30K седиментації від 50 мл до 80 мл знаходилися у діапазоні значень твердості від 5 до 45–48 одиниць приладу Inframatic 8611.

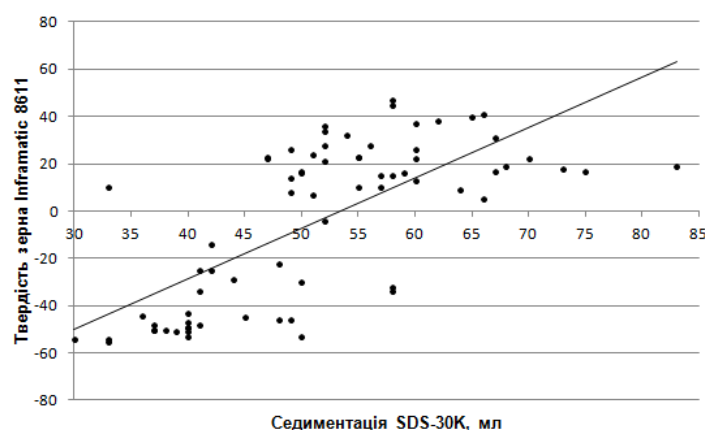


Рис. 8.7. Залежність між твердістю зерна та седиментацією SDS-30K борошна селекційних ліній озимої пшениці ($n = 71$, $r = 0,711$, $P > 0.05-0.001$).

У результаті багаторічних наукових досліджень створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації різного напрямку використання (табл. 8.7). До Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Російській Федерації та Республіці Молдова занесено 31 сорт пшениці м'якої озимої, в тому числі в Україні – 29 сортів ('Астарта', 'Софія, Київська', 'Донор Київський' та інші), в Російській Федерації – сорт 'Астарта', в Республіці Молдова – сорт 'Сотниця'. Дані сорти на державному рівні визнані селекційним досягненням, а їх новизна закріплена 31 авторським свідоцтвом України, Російської Федерації та Республіки Молдова.

Нові сорти стійкі до несприятливих чинників довкілля, забезпечують отримання високих урожаїв зерна високої якості. Кваліфікаційну експертизу в Державному сортовивченні України, Республіці Казахстан та Республіці Туреччина проходять 13 сортів пшениці м'якої озимої в тому числі: в Україні 9 сортів ('Альта', 'Степова криниця', 'Нагорода', 'Довіра', 'Вежа Київська', 'Благовіщенська', 'Трояна', 'Благодатна', 'Синтетик 240'), в Республіці Казахстан – сорт 'Снігурка', в Республіці Туреччина – 3 сорти пшениці м'якої озимої ('Бужанка', 'Новосмуглянка', 'Соломія').

Таблиця 8.7

Авторські свідоцтва на сорти озимої пшениці

№	Свідоцтво на авторство	Номер свідоцтва	Рік видачі
1	на сорт озимої пшениці Сотниця	120154	2014
2	на сорт озимої пшениці Орійка	120157	2014
3	на сорт озимої пшениці Астарта	140639	2014
4	на сорт озимої пшениці Придніпровська	140640	2014
5	на сорт озимої пшениці Покрова	141024	2014
6	на сорт озимої пшениці Софія Київська	141023	2014
7	на сорт озимої пшениці Здоба Київська	141028	2014
8	на сорт озимої пшениці Коляда	141112	2015
9	на сорт озимої пшениці Золото України	160548	2016
10	на сорт озимої пшениці Новосмуглянка	160512	2016
11	на сорт озимої пшениці Соломія	160543	2016
12	на сорт озимої пшениці Бужанка	170768	2017
13	на сорт озимої пшениці Бондарівна	170769	2017
14	на сорт озимої пшениці Зореслава	170770	2017
15	на сорт озимої пшениці Стрітенська	171137	2018
16	на сорт озимої пшениці Світогляд	180225	2018
17	на сорт озимої пшениці Городниця	171142	2018
18	на сорт озимої пшениці Перлина Поділля	171140	2018
19	на сорт озимої пшениці Боровиця	171138	2018
20	на сорт озимої пшениці Світоч	180874	2019
21	на сорт озимої пшениці Порадниця	180873	2019
22	на сорт озимої пшениці Січеслава	200479	2020
23	на сорт озимої пшениці Плеяда	200483	2020
24	на сорт озимої пшениці Донор Київський	200488	2020
25	на сорт озимої пшениці Аміна	200482	2020
26	на сорт озимої пшениці Джамала	200481	2020
27	на сорт озимої пшениці Академічна 100	200788	2020
28	на сорт озимої пшениці Ювілейна Патона	200790	2020
29	на сорт озимої пшениці Світязь	200789	2020
30	Російської Федерації на сорт озимої пшениці Астарта	72491	2018
31	Республіки Молдова на сорт озимої пшениці Сотниця	730(3)	2018

Нові сорти пшениці м'якої озимої, створені методом хромосомної інженерії ('Смуглянка', 'Золотоколоса', 'Фаворитка', 'Астарта' та інші), забезпечили отримання рекордних урожаїв зерна – 124–140 ц/га, успішно конкурують із зарубіжними аналогами і займають великі посівні площі. Вони мають комплексний імунітет до основних хвороб і придатні для вирощування в органічному землеробстві та на зрошенні. Сорти пшениці м'якої озимої ('Здоба Київська', 'Софія Київська', 'Городниця', 'Аміна', 'Джамала', 'Донор

Київський' та інші), які відносяться до сильних пшениць, мають високу якість зерна. Серед них унікальний сорт 'Донор Київський', який за якістю відноситься до екстрасильних пшениць, має високий вміст білка (18–20 %) та його якість (показник сили борошна W 450–900.о.а.).

Підсумовуючи, слід зазначити, що ґрунтуючись на генетичній базі, оригінальній за походженням і ефектом дії на біосинтез білків, крохмалю і біоактивних компонентів зерна, нами ініційовано кілька нових напрямів селекції озимої пшениці, яких раніше не було в Україні. Це дозволить вивести на зерновий ринок України нові сорти даної культури з біохімічними, технологічними і харчовими характеристиками зерна, необхідними для розробки нових продуктів харчування з функціональним статусом та нових напрямів технологічного використання зерна.

Започатковано програму створення цінного селекційного матеріалу пшениці за ознаками стійкості до хвороб, посухостійкості та якості зерна на основі використання генетичної плазми егілопсів – дикорослих співродичів м'якої пшениці. За цілеспрямованих схрещувань в геном даної культури перенесено цілу серію алелів глютенін- та гліадинкодуєчих локусів та ген, який викликає екстрам'який тип консистенції ендосперму, чим створено генетичну базу для селекції екстрасильних за характеристиками хлібопекарської якості сортів пшениці.

У серії експериментів на різному генетичному фоні та за контрастних умов вирощування доведено ефективність використання гена *Gpc-B1*, перенесеного від дикорослої пшениці емер, у селекційних програмах пшениці з метою підвищення вмісту білка і ключових мікроелементів у зерні, поліпшення його технологічної і споживчої цінності. Отримано агрономічно цінні селекційні лінії озимої пшениці з підвищеним вмістом протеїну та ключових нутрієнтів – заліза, марганцю, цинку та селену.

Розпочато дослідження генетичних систем, що контролюють колір зерна та отримано генотипи пшениці з білим, чорним та голубим кольором зерна з високою антиоксидантною активністю, як основи для нового напрямку

селекції пшениці круп'яного використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна.

На підставі проведених досліджень можна зробити наступні узагальнення:

- застосовуючи різні взаємодоповнюючі молекулярно-генетичні маркерні системи та адаптуючи їх для проведення мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій обґрунтовано наукові основи молекулярної селекції пшениці на високі продуктивність та хлібопекарську якість;
- доведено ефективність використання гена *Gpc-B1*, перенесеного від дикорослої пшениці емер, у селекційних програмах пшениці з метою підвищення вмісту білка і ключових мікроелементів у зерні, поліпшення його технологічної і споживчої цінності;
- встановлено, що нові сорти-інновації, створені в ІФРГ НАН України, є носіями оригінальних алелів глютенін- та гліадинкодуєчих локусів, які не зустрічаються у відомих каталогах і раніше не спостерігались в українських сортах. Отримано ряд унікальних генотипів за алельним складом генів запасних білків, які можуть бути використані для створення принципово нових для України сортів пшениць хлібопекарського та кондитерського напрямів використання;
- науково обґрунтовано новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна, що є основою для появи на продовольчому ринку нашої держави нових продуктів функціонального харчування. Для цього успішно здійснюється біофортificaція зерна шляхом селекційного привнесення в генотип рослини унікальних мутантних генів дикорослих співродичів чи біотехнологічних генетичних конструкцій, спроможних радикально змінювати співвідношення компонентів крохмалю, збільшувати вміст білка і мінералів, покращувати його антиоксидантну активність. Створено оригінальний селекційний матеріал пшениці та спельти з різним кольором зерна (фіолетовим, чорним, синім) і його високою біологічною цінністю.

Публікації пошукача, видані за даним розділом:

1. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М., 2011. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів. *Физиология и биохимия культурных растений*, 43(6), С. 463-477.
2. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М., 2012. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків. *Физиология и биохимия культурных растений*, 44(1), С. 3-22.
3. Рибалка О.І., Червоніс М.В., **Моргун Б.В.**, Починок В.М., Поліщук С.С., 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку технологічного використання зерна. *Физиология и биох. культурных растений*, 45(1), С. 3-19.
4. **Моргун Б.В.**, Степаненко А.И., Чугункова Т.В., 2013. Молекулярно-генетический анализ сортообразцов озимой пшеницы, выращенных в различных экологических зонах Украины. *Известия Самарского науч. центра Российской академии наук*, 15(3(4)), С. 1390–1393.
5. Morgun V.V., Gavrilyuk M.M., Oksem V.P., Morgun B.V., Pochynok V.M., 2014. Introduction of new stress-resistant and high-yielding winter wheat varieties based on chromosome engineering and marker-assisted selection. *Science and Innovation*, 10(5), P. 36-43.
6. **Моргун Б.В.**, 2016. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*, 48(4), С. 324-343.
7. Morgun B.V., Stepanenko A.I., Stepanenko O.V., Bannikova M.O., Holubenko A.V., Nitovska I.O., Maystrov P.D., Grodzinsky D.M., 2016. Implementation of molecular systems for identification of genetic polymorphism in winter wheat to obtain high-performance specialized varieties. *Science and Innovation*, 12(2): 40-56.

8. Рибалка О.І., Поліщук С.С., **Моргун Б.В.**, 2018. Нові напрями в селекції зернових культур на якість зерна. *Вісн. агр. наук*, 11(788), с. 120–133.
9. Рибалка О.І., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Поліщук С.С., 2019. Генетичні основи нового напрямку селекції оригінальних за якістю зерна класів пшениці (*Triticum aestivum* L.) і тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack). *Физиология растений и генетика*, 51(3), с. 207-240.
10. Рибалка О.І., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, 2020. Кольорове зерно пшениці і ячменю – нова стратегія селекції зернових культур із високою біологічною цінністю зерна. *Фізіологія рослин і генетика.*, 52(2), с. 95–127.
11. Моргун В.В., Рибалка О.І., **Моргун Б.В.** Кольорове зерно – нова стратегія створення зернових культур з високою біологічною цінністю. Інформаційне видання «Національна академія наук України у 2019 році». Київ, Видавничий дім "Академперіодика" НАН України, 24.03.2020.
12. Моргун В.В., Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, 2021. Нові наукові напрями генетичного поліпшення злакових культур. *Фізіологія рослин і генетика*, 53(3), с. 187–215.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

На сьогодні прогрес у створенні високопродуктивних сортів культурних злаків з поліпшеною якістю зерна та підвищеним адаптивним потенціалом до несприятливих умов довкілля неможливий без використання новітніх методів і технологічних рішень, які дозволяють прискорено отримувати різноманітні генотипи, що можуть використовуватись як вихідний матеріал з новими ознаками і якостями. Генетичне поліпшення рослин зумовлюється зростаючими вимогами сільськогосподарського виробництва до сортів та гібридів. Знання щодо методів та способів удосконалення рослин постійно розширюються і поглиблюються. Розробка новітніх методів створення високопродуктивних сортів культурних злаків вимагає комплексного підходу та мобілізації новітніх досягнень в галузі сучасної біології. Створення таких технологій сприяє проведенню цілеспрямованого добору вихідного матеріалу та розширює можливості щодо прискорення селекції сортів злакових культур з певними технологічними ознаками, зокрема й з поліпшеною якістю зерна, що і зумовило актуальність та необхідність виконання наших досліджень.

Отримання ефективних векторних конструкцій є актуальною проблемою генетичної інженерії рослин. У результаті досліджень розроблено методичні основи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин.

Створення генетично модифікованих рослин сільськогосподарських культур є актуальним напрямом сучасного генетичного поліпшення рослин. У світі проведено та проводиться багато досліджень з оптимізації методик, за використання яких підвищується ефективність генетичної трансформації злакових культур. Основні зусилля спрямовані на встановлення та дослідження всіх чинників, які впливають на процес трансформації та

розробку нових протоколів, які б забезпечували високу ефективність отримання біотехнологічних рослин, а також легко відтворювалися у різних лабораторіях.

Розробка ефективного протоколу регенерації рослин пшениці в культурі *in vitro* – найбільш важливий етап в процесі її генетичної трансформації. Нами вперше вивчено вплив синтетичних ауксиноподібних регуляторів росту – піклорами та дикамбі – на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Підібрано компоненти живильного середовища МСР4 (0,5 мг/л БАП; 0,15 мг/л піклорам), які підвищують частоту регенерації пагонів у пшениці до 35 %. Утворені на такому культуральному середовищі рослини здатні адаптуватися до ґрунтових умов та характеризуються високою життєздатністю.

Проведена оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*. Розроблено ефективну систему елімінації клітин *A. tumefaciens* штамів C58 та GV3101, яка передбачає використання антибіотика β-лактамної групи тиментину. Вперше досліджено його дію на морфогенетичні процеси у пшениці. Для стимуляції регенераційних процесів у різних генотипів пшениці потрібно індивідуально підбирати концентрації антибіотиків.

Нами досліджена можливість використання антибіотика тиментину як самостійного екзогенного регулятора росту пшениці. Встановлено, що тиментин проявляє ауксиноподібні властивості: за його наявності у живильному безгормональному середовищі спостерігається інтенсивний ризогенез. Відповідно до цього можна стверджувати, що антибіотик β-лактамної групи тиментин має властивості регулятора росту, однак він може бути використаний лише як додатковий стимулятор морфогенетичних процесів у пшениці.

Ці дослідження і отримані результати були використані для розробки протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro*, який крім регенераційної системи включає використання:

оптичної щільності клітин бактеріальної суспензії $OD_{600} = 0,4$ оп.од.; ацетосирінгону у концентрації 200 мкМ; антибіотика паромоміцину в якості селективного агента. Використовуючи оптимізований протокол проведена *Agrobacterium*-опосередкована трансформація калюсних культур пшениці генетичними векторами p014 та pCB203. Частота трансформації вектором p014 сорту 'Подільянка' становила 2,7 %, а сорту 'Зимьярка' – 2,4 %. Після використання вектора pCB203 (селективний агент фосфінотрицин) частота трансформації калюсу, одержаного з незрілих зародків пшениці сорту 'Зимьярка', становила 1,2 %, а з калюсу апікального походження – 1,6 % (сорт 'Зимьярка') та 1,8 % (сорт 'Подільянка'), що свідчить про однакову ефективність використання калюсу пшениці м'якої різного походження для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Але калюси, отримані з апікальних меристем пагона, доступні для використання впродовж цілого року, що робить їх більш привабливими для отримання трансформантів пшениці.

Також нами оптимізовано методику *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*, в результаті чого частота трансформації пшениці зросла до 20,7 %. Підтверджено негативний вплив сахарози в інокуляційному середовищі на частоту трансформації рослин пшениці *in planta*. За її наявності частота трансформації становила 2,3 %, а за відсутності – 15,6 % (ген *bar*) та 20,7 % (ген *nptII*). Виявлено, що частота трансформації за використання методу *in planta* на порядок вища, ніж за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro*. Але можливість проведення експериментів тільки впродовж часу цвітіння пшениці в природних умовах обмежує можливості використання цього методу.

Виконані експериментальні дослідження засвідчили вплив умов навколишнього середовища на процес трансформації пшениці методом *in planta*. Для сорту 'Подільянка' температурний режим $t \approx 24^{\circ}\text{C}$ і помірна вологість повітря сприяють максимальній ефективності зав'язування насіння ($40,6 \pm 1,5$ %) та отриманню трансформантів (7,3 %). При зниженні

температури до 16 °C зменшується ефективність перенесення Т-ДНК у рослинний геном. При підвищенні температури до 27 °C частота появи трансгенних за геном *bar* рослин дещо знижується і становить 2 %. Ймовірно, це пов'язано із блокуванням утворення *Vir*-залежних агробактеріальних Т-пілів, які необхідні для успішної передачі Т-ДНК, і для яких високі температурні показники є критичними.

Трансгенна природа рослин пшениці, отриманих після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* та *in planta*, підтверджена за допомогою ПЛР, ЗТ-ПЛР. Про експресію *bar* гена також свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду як в умовах *in vitro*, так і в умовах мікроділянкового дослідю. Вперше отримано рослини пшениці сортів 'Подільська' та 'Зимовка', стійкі до фосфінотрицину (гербіцид Баста®).

Наслідком перенесення чужорідної ДНК може бути порушення стабільності геному трансформованої рослини, через що спостерігається підвищення частоти генетичних перебудов та активація МГЕ. Явище транспозиції являє значний інтерес, оскільки показано його роль як у зміні експресії структурних генів, так й індукції хромосомних аберацій. Нами методом IRAP-аналізу з праймером до LTR послідовностей ретротранспозону SIRE-1 виявлено появу нових, відносно високомолекулярних (довжиною більше 1000 п.н.), ампліконів у трансформованих калюсних ліній пшениці, що свідчить про транспозицію даного МГЕ. Оскільки, нові фрагменти ДНК виявлені у трьох з семи досліджуваних ліній та були відсутні у контрольному калюсі, це може свідчити, що індукція транспозиції SIRE-1 можливо зумовлена геномним стресом, спричиненим вбудовуванням чужорідної ДНК, або стресом, безпосередньо пов'язаним з процесом трансформації. Таким чином, експериментально підтверджено, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів. В той же час, у генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять

дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, не виявлено відмінностей від нетрансгенних форм за генетичною структурою, що може бути пов'язане з явищем РНК-інтерференції, яка пригнічує активність ретротранспозонів.

Стійкість до гербіцидів є однією з важливих ознак сільськогосподарських рослин, зокрема кукурудзи. Вона не є природною, проте її можна досягти шляхом генетичної трансформації. Нами оптимізовані окремі етапи протоколу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Виділений гібрид R₂PLS61×PLS61 з високою та тривалою регенераційною здатністю. Показано перспективність використання гліфосату у концентрації 0,01 мМ для добору трансгенних форм кукурудзи. Встановлено позитивний ефект антибіотика цефотаксиму на регенераційну здатність калюсів кукурудзи, отриманих з незрілих зародків, і негативний – фосфінотрицину та паромоміцину. Виявлено, що кількість регенерантів, отриманих на селективних середовищах із гліфосатом, більша за щільності клітин агробактеріальної суспензії 0,3 оп.од. порівняно з 0,4 оп.од. За допомогою методу *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in vitro* отримано трансгенні рослини кукурудзи, які несуть цільовий ген *cp4 epsps*, продукт якого надає стійкості до гліфосату.

Також оптимізовані окремі етапи протоколу біолістичної трансформації кукурудзи в умовах *in vitro*. Встановлено, що найкращим для трансформації рослинним матеріалом є незрілі зародки з калюсами, які до обстрілу культивувалися 9 діб. Серед 21 генотипу кукурудзи, які створені та вирощуються на території України, були відібрані 4 генотипи, найбільш компетентні до біолістичної трансформації. Отримано стійкі до фосфінотрицину рослини-регенеранти, у яких виявляється активність ферменту β-глюкуронідази. Встановлено певну кореляцію між рівнями транз'єнтної експресії β-глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи.

Проведена морфобіологічна оцінка трансформантів, які несуть чужорідний ген *bar*, в поколіннях T₀–T₆ дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку. Аналіз трансформантів свідчить про явища, які зазвичай супроводжують інцухтування і підвищення гомозиготності – зниження висоти рослин, розщеплення на окремі сім'ї, диференціацію сімей за морфологічними ознаками тощо. Встановлено, що трансгенні рослини T₂–T₃ мають деяке відставання в розвитку, зокрема, за термінами цвітіння чоловічих і жіночих суцвіть, за висотою рослини, що може розглядатися як звичайна реакція на дію стресового чинника, або як наслідок вбудовування трансгена в рослинний геном. Між рослинами всередині сімей T₂ та T₃ спостерігається більша варіабельність за дослідженими ознаками, ніж в контролі, що дозволяє припустити наявність рослин з різним ступенем стійкості до гербіциду Баста. Частота виживаності рослин T₆ за гербіцидної обробки становила 100 %, висота рослин трансформантів без гербіцидної обробки та за умов гербіцидної обробки достовірно не різнилася, що вказує на успішний добір на селективному фоні, а також стабілізацію рослинного геному в ряду поколінь.

Несанкціоноване занесення трансгенних рослин на територію України є важливою проблемою, яка потребує детального аналізу і вирішення. В Україні існує проблема безконтрольного розповсюдження трансгенних рослин на полях та продуктів їх переробки в торгівельній мережі. У зв'язку з потребою масового скринінгу зразків на присутність штучних генетичних конструкцій нами розроблена нова вдосконалена методика детекції трансформаційних подій на основі полімеразної ланцюгової реакції. Застосування удосконаленої методики мультиплексної ПЛР для проведення аналізу дає змогу знизити витрати на реактиви, заощаджувати трудовитрати, зменшити завантаження устаткування і збільшити швидкість проведення експерименту.

Проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин, зокрема кукурудзи, ріпаку та сої, на сільськогосподарських полях окремих областей України. Дослідження кукурудзи Київської області на присутність трансформаційних подій MON810, GA21 та NK603 показало, що середня частота їх зустрічальності (лінії MON810 та GA21) в Україні станом на весну 2009 року, становить приблизно 4 %. Це було першим повідомленням про знаходження відновлюваного джерела, тобто насіння генетично модифікованої кукурудзи зарубіжного походження, на теренах України. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність занесених трансгенних форм засвідчила наявність трансформаційних подій NK603 та Vt176 з частотою зустрічальності 5–10 %.

Ідентифікація трансгенного статусу гербіцидостійкого ріпаку на території Київської області підтвердила присутність у декількох рослинах глюфосинату амонію та гліфосату, трансгену *bar* і трансформаційної події GT73 з трансгеном *cp4 epsps*. Хоча виявлення трансгенних рослин ріпаку, занесених із-за кордону, залишається рідким явищем, проте завдяки їх здатності до самовідтворення і перехресного запилення, можливе поступове неконтрольоване поширення генетично модифікованих рослин на території України.

Вивчення вмісту ГМ-сої у харчових продуктах показало, що з 45 опрацьованих зразків 29 містять у своєму складі ген *lectin*, специфічний для сої, серед них 23 харчові продукти, що відповідно вказує на присутність добавок сої в них. З 29 зразків 6 дали позитивну реакцію на трансформаційну подію GTS 40-3-2, серед них 5 зразків сої (Київська, Черкаська та Кіровоградські області) та 1 зразок харчового продукту іноземного виробництва, що представлений соєвим білком для спортсменів. Цей факт є прямим свідченням того, що на території цих областей вирощується трансгенна (ГМО) соя. Отримані дані свідчать про наявність та, очевидно, вирощування трансгенного матеріалу сої на території України. У харчових продуктах ГМ соя виявлена в одному зразку соєвого білка, але іноземного

виробництва. Наявність *pos*-термінатора в харчових продуктах може свідчити про присутність трансгенного матеріалу інших культур.

Одним із сучасних методів генетичного поліпшення рослин та інтенсифікації процесу отримання нових сортів злакових культур є маркер-допоміжна селекція, яка використовується в селекційних програмах в якості новітнього методичного прийому поряд з методами традиційної селекції. Отримання нових сортів у такий спосіб прискорюється і може зайняти від 5–7 років залежно від виду рослин. Використання молекулярних маркерів покращує ефективність кожного етапу селекції з точки зору витрат праці та часу. Зважаючи на це, пошук нових, більш ефективних і зручних ДНК-маркерних систем для проведення молекулярно-генетичного аналізу, продовжує бути вкрай актуальним. У зв'язку з цим, нами були створені системи ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки.

Розроблено дев'ять систем на основі IRAP, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур. Досліджено генетичне різноманіття генотипів м'якої пшениці і спельти за IRAP-маркерами та показано рівень генетичної відмінності між вивченими сортами цих видів. Виявлена висока ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону *Sukkula* як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів *Wilma07* і *Nikita* у дослідженнях геному ячменю.

Встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP *Sukkula*+A17898 та *Sukkula*+HB10, для яких відсоток виявленого поліморфізму становить 50 % та 23,07 %, відповідно. Побудовано філогенетичне дерево, в результаті чого встановлено, що зразки сортів 'Ятрань 60' і 'Наталка', а також 'Славна' і 'Спасівка' мають подібний генотип.

Мономорфні фрагменти, що виявляються при електрофорезі продуктів ПЛР у сортів різних злаків, чіткіше позначають спільність структурно-функціональної організації їх геномів. При цьому кожен з вивчених сортів має свій певний спектр ампліфікованих IRAP та REMAP продуктів, що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. Аналіз отриманих результатів, представлених у вигляді дендрограм коефіцієнтів генетичної схожості, показав, що вивчені сорти характеризуються порівняно високим рівнем міжсортного поліморфізму. Слід зазначити, що аналіз міжвидової спорідненості має значення не тільки для вирішення питань філогенії і систематики, але й для селекції, що базується на методах віддаленої гібридизації.

Здійснено хімічний мутагенез тритикале для відбору рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*. Проведено молекулярне дослідження мутантних рослин з використанням IRAP-маркерів, в результаті якого підтверджено зміни у геномі тритикале під дією мутагенів.

Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах м'якої озимої пшениці та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm626*, *Xgwm508*, *Xgwm193*, *Xgwm219*, що розташовані на 6В хромосомі, і обраховано частоту рекомбінації локусів, яка становить для *Xgwm508* = $2,94 \pm 1,28$ %, *Xgwm193* = $3,96 \pm 1,51$ %, *Xgwm626* = $2,98 \pm 1,29$ %, *Xgwm219* = $6,77 \pm 2,08$ %.

Аналіз рослин F_4 і F_5 поколінь на вміст біологічно важливих елементів методом ICP-MS виявив, що присутність гена *Gpc-B1* зумовлює статистично достовірне підвищення рівня накопичення у зернівках заліза, цинку, марганцю, міді, селену та магнію. Комплексний аналіз вмісту загального білка зернівок у рослин F_5 покоління методом К'ельдаля та NIR показав, що ген *Gpc-B1* зумовлює підвищення вмісту білка на 14 % порівняно з вихідним сортом 'Куяльник'. В цілому, виконані комплексні дослідження генетичних

ефектів гена *Gpc-B1*, інтродукованого з *T. turgidum* ssp. *dicoccoides*, дозволили започаткувати технологію добору ліній м'якої озимої пшениці, у яких поліпшена якість зерна. Застосована біотехнологія маркер-допоміжної селекції забезпечила створення новітнього селекційного матеріалу пшениці з підвищеним вмістом білка та корисних мікроелементів у зерні у поєднанні з високими господарсько-цінними властивостями рослин.

Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* методом ПЛР. Здійснена оцінка 44 гібридних сімей F_5 покоління, носіїв гена *Gpc-B1*, на наявність алельних субодиниць генів *Glu-1* запасних білків. За трьома локусами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* виявлено 16 найбільш цінних сімей, які мають оптимальну для хлібопекарської якості алельну формулу локусу *Glu-1* (*Glu-A1a* або *Glu-A1b*, *Glu-B1a1*, *Glu-D1d*). Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці, а максимальний ефект цінного алеля досягається правильним підбором генетичного оточення.

Методом ПЛР визначено алельний стан генів *Pina-D1* та *Pinb-D1*, які відповідають за консистенцію ендосперму зернівки пшениці. Серед дослідженої вибірки сортів та гібридів пшениці ген *Pina-D1* не виявив поліморфності. У багатофакторному дисперсійному аналізі впливу різних алелів генів *Pinb-D1*, *Wx-A1*, *Wx-B1*, *Wx-D1* та їх комбінацій на твердозерність гібридів пшениці було виявлено спільний вплив ($p < 0,01$) комбінацій алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*. Проте детальніший однофакторний дисперсійний аналіз цих комбінацій на тих самих даних не дає можливості однозначно підтвердити такий вплив ($p < 0,1$). Пояснити цю ситуацію можна недостатньою кількістю проаналізованих ліній для кожної комбінації алелів, що вимагає додаткових досліджень з виявлення таких комбінацій у нових генотипів.

На відміну від гібридів, де було показано сильний вплив ($p < 0,001$) на твердозерність наявності тих чи інших алелів гена *Pinb-D1*, у комерційних

сортів української селекції такого впливу не виявлено, що свідчить про те, що імовірно дія гена *Pinb-D1* залежить від генетичного оточення. Також було показано, що комбінація алелів генів *Wx-A1* та *Wx-D1*, можливо, також впливає на твердозерність.

Створено та використано маркерну систему для визначення перенесення модифікованого локусу із геном *SBEIIa*, який викликає збільшення накопичення амілози в зерні. Відібрано перспективні для залучення в селекційний процес зразки.

За допомогою системи ДНК-маркерів визначено алельний склад генів *Psy1*, які відповідають за накопичення каротиноїдів у зерні злакових культур, у 162 сортів та гібридів пшениці вітчизняної та зарубіжної селекції. Серед дослідженої вибірки сортів було відібрано зразки пшениці, у яких можна очікувати найвищу концентрацію каротиноїдів: 'Білява', 'Доброчинна', 'Косовиця', 'Лановий', 'Лідер', 'Одеська 265', 'Одеська 51', 'Панна', 'Писанка', 'Повага', 'Полба' (Німеччина), 'Селянка', 'Супутниця'.

Показано, що використання молекулярно-генетичних маркерів може бути ефективним для аналізу геномів пшениці на наявність алелів генів *PPO*, що відповідають за активність поліфенолоксидази.

Встановлено, що підібрані маркерні системи (молекулярно-генетичний аналіз ДНК та електрофоретичне визначення білків) є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах озимої м'якої пшениці. Показано, що комплексне використання двох пар цільових праймерів *SCM9* та *PAWS5/S6* до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації. На підставі цитогенетичного аналізу встановлено, що сорти з пшенично-житніми транслокаціями диференціюються за кількістю аномалій у мейозі.

Ґрунтуючись на генетичній базі, оригінальній за походженням і ефектом на біосинтез білків, крохмалю і біоактивних компонентів зерна,

нами ініційовано кілька нових напрямів селекції озимої пшениці, яких раніше не було в Україні. Це дозволить вивести на зерновий ринок України нові сорти даної культури з біохімічними, технологічними і харчовими характеристиками зерна, необхідними для розробки нових продуктів харчування з функціональним статусом та нових напрямів технологічного використання зерна.

Започатковано програму створення цінного селекційного матеріалу пшениці за ознаками стійкості до хвороб, посухостійкості та якості зерна на основі використання генетичної плазми егілопсів – дикорослих співродичів м'якої пшениці. За цілеспрямованих схрещувань в геном даної культури перенесено цілу серію алелів глютенін- та гліадинкодуєчих локусів та ген, який викликає екстрем'який тип консистенції ендосперму, чим створено генетичну базу для селекції екстрасильних за характеристиками хлібопекарської якості сортів пшениці.

Розпочато дослідження генетичних систем, що контролюють колір зерна, та отримано генотипи пшениці з білим, чорним та голубим кольором зерна, з високою антиоксидантною активністю як основи для нового напрямку селекції пшениці круп'яного використання з поліпшеною харчовою цінністю зерна.

Результати, одержані в роботі, роблять внесок у розробку нових технологій генетичного поліпшення злакових культур методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції, сприяють проведенню цілеспрямованого добору вихідного матеріалу та розширюють можливості щодо прискорення селекції сортів з певними технологічними ознаками, зокрема й з поліпшеною якістю зерна, стійких до екологічних стресів.

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи розроблено теоретичні основи та технології створення високопродуктивних сортів озимої пшениці та інших злакових культур, яким властиві висока якість зерна та стійкість до несприятливих чинників довкілля. Оптимізовано технології генетичної трансформації пшениці і кукурудзи в культурі *in vitro* та методом *in planta* для отримання трансгенних рослин, стійких до гербіцидів. Розроблено методичні основи та практичні засади використання ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму найбільш поширених в Україні зернових культур та генотипування пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. На підставі застосування різних взаємодоповнюючих молекулярно-генетичних маркерних систем, їх адаптації для проведення мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій, обґрунтовано наукові основи молекулярної селекції пшениці. На основі розроблених методів молекулярної селекції створено новий оригінальний матеріал та сорти пшениці м'якої озимої, які внесені до Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Республіці Молдова та Російській Федерації. Це підтверджує актуальність проведених фундаментальних досліджень та їх цінність для біологічної науки й аграрного виробництва.

1. Розроблено принципи конструювання векторів та добору послідовностей ДНК на прикладі модельного виду *Physcomitrella patens* та антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, які можна використовувати для генетичної інженерії рослин.
2. Визначено структуру гена *shp1* моху *Physcomitrella patens* та підтверджено факт наявності подібних послідовностей в різних таксонах рослин. Найбільша подібність виявлена у *P. patens* та *Warnstorfia fontinaliopsis*. На основі біоінформатичного аналізу послідовностей мітохондріальної ДНК *D. antarctica* показана висока (понад 90 %) гомологія з мітохондріальними

геномами представників родини Злакових (*Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Bambusa oldhamii* та ін.).

3. Вперше вивчено вплив синтетичних регуляторів росту – піклораму та дикамби – на частоту регенерації з калюсної культури пшениці апікального походження. Показано, що найбільш ефективним є використання у середовищі 0,15 мг/л піклораму у поєднанні з 0,5 мг/л БАП, за якого спостерігається швидке утворення морфогенних ділянок і найбільша кількість пагонів.
4. Оптимізовано умови проведення *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці м'якої в культурі *in vitro* і методом *in planta*, та вперше отримано рослини пшениці вітчизняних сортів 'Подільська' та 'Зимоярка', стійкі до фосфінотрицину (гербіцид Баста®).
5. У трансгенних калюсних ліній пшениці, отриманих шляхом біолістичної трансформації, методом IRAP-аналізу проаналізовано рівень поліморфізму ділянок ДНК, фланкованих інвертованими LTR повторами ретротранспозону SIRE-1, та виявлено їх відмінності від нетрансгенних форм за генетичною структурою. В спектрах продуктів ампліфікації ДНК відмічено появу нових ампліконів, що свідчить про активацію та транспозицію даного МГЕ. Підтверджено, що саме інсерція чужорідної ДНК здатна індукувати транспозицію мобільних генетичних елементів.
6. У генетично модифікованих рослин пшениці, отриманих шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації в культурі *in vitro*, що містять дволанцюговий РНК-супресор гена проліндегідрогенази, у спектрах продуктів ампліфікації ДНК не відмічено появи нових ампліконів, що свідчить про відсутність активації транспозиційної активності МГЕ, що імовірно може бути пов'язано з явищем РНК-інтерференції, яка пригнічує активність ретротранспозонів.
7. Удосконалено окремі елементи технології отримання трансгенних рослин кукурудзи в культурі *in vitro* методами біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Отримано трансгенні рослини кукурудзи,

стійкі до гліфосату та фосфінотрицину. Встановлено певну кореляцію між рівнями транзйентної експресії β -глюкуронідази для різних генотипів кукурудзи і результатами зі стабільної трансформації, що може бути використано для швидкого відбору компетентних для трансформації генотипів кукурудзи. Морфобіологічна оцінка трансформантів кукурудзи, які несуть чужорідний ген *bar*, в поколіннях T_0 – T_6 дозволила охарактеризувати стійкість рослин за виживаністю, основними показниками росту і розвитку.

8. Розроблено нову вдосконалену методику детекції трансформаційних подій на основі мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції та проведено моніторинг розповсюдження трансгенних рослин кукурудзи на території України, який засвідчив їх присутність з частотою від 4 до 10 %.
9. Розроблено 9 систем на основі IRAP та 5 систем на основі REMAP-маркерів, що дозволяють ефективно детектувати поліморфні локуси між ретротранспозонами різних злакових культур, зокрема пшениці, тритикале, спельти й ячменю. Встановлено, що кожен з вивчених сортів різних культур має свій певний спектр ампліфікованих IRAP і REMAP продуктів, що відрізняється від інших за їх кількістю, розміром і ступенем вираженості. Проаналізовано міжвидову спорідненість, яка важлива для вирішення питань селекції, що базується на методах віддаленої гібридизації.
10. Встановлено, що найефективнішими для дослідження генетичного різноманіття пшениці є розроблені системи REMAP Sukkula+A17898 та Sukkula+HB10. Виявлено високу ефективність ПЛР на основі праймерів до ретротранспозону Sukkula як за окремого використання, так і у комбінаціях з праймерами до ретротранспозонів Wilma07 і Nikita у дослідженнях геному ячменю. Показано ефективність застосування IRAP-маркерів для підтвердження змін у геномі тритикале під дією мутагенів та для добору мутантних рослин, які несуть нуль-алель за житнім геном *Wx*.

11. Проведено моделювання праймерів та перевірено їх ефективність для визначення трансгенних екстракопій алелів локусу *Glu-A1* пшениці методом ПЛР. Показано, що комбінування в нащадках алелів, відповідальних за підвищення якості борошна, є важливим етапом створення екстрасильних сортів пшениці.
12. Вперше з використанням різних молекулярних маркерів проведено комплексний аналіз сучасних сортів пшениці, що вирощуються в різних ґрунтово-кліматичних умовах України. На основі отриманих даних показано їх відмінності за геномною варіабельністю, визначено рівні внутрішньовидового поліморфізму сортів та їх філогенетичного споріднення. Результати вивчення міжсортного та внутрішньосортного поліморфізму за дослідженими цільовими генами впроваджено у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України, спрямовані на усунення гетерогенності та підвищення генетичної чистоти (гомогенності) сортів зернових злаків та їх поліпшення за головними технологічними характеристиками якості зерна.
13. Розроблено й оптимізовано систему ДНК-маркерів для добору та генотипування сортів пшениці за генами, які детермінують важливі господарсько-цінні ознаки. Проведено скринінг нових, елітних і стародавніх сортів м'якої та твердої пшениці на розповсюдження алельних варіантів господарсько-корисних генів. Серед проаналізованих генотипів пшениці виявлено донори цінних алелів. На основі отриманих даних опрацьовано теоретичну концепцію використання та контролю досліджених генів і генетичних систем у селекції пшениці за комплексом господарсько-цінних ознак. Положення концепції впроваджено у практичні селекційні програми Інституту фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення НААН України. Перспективний

селекційний матеріал з цільовими генами переданий у Державне сортовипробування.

14. Методами маркер-допоміжної селекції підтверджено, що нові сорти-інновації, створені в ІФРГ НАН України, є носіями оригінальних алелів глютенін- та гліадинкодуєчих локусів, які не зустрічаються у відомих каталогах і раніше не спостерігались в українських сортах. Отримано ряд унікальних генотипів за алельним складом генів запасних білків, які можуть бути використані для створення принципово нових для України сортів пшениць хлібопекарського та кондитерського напрямів використання.
15. Розроблено домінантну та кодомінантну молекулярно-генетичні системи ДНК-маркерів для виявлення гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* в рослинах пшениці м'якої озимої та чотири кодомінантні молекулярно-генетичні системи ДНК маркерів до SSR локусів *Xgwm193*, *Xgwm219*, *Xgwm508*, *Xgwm626*.
16. Вперше в Україні впроваджено у практичну селекцію пшениці в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України та Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннізнавства та сортовивчення НААН України унікальний ген *Gpc-B1* та маркерну систему його контролю у селекційних популяціях. Впровадження гена *Gpc-B1* у практичну селекцію започатковує нову для української селекції стратегію контрольованого генетичного поліпшення сортів пшениці за вмістом білка в зерні та ключових мікроелементів. На основі цього впровадження створено перспективний селекційний матеріал пшениці, готовий до передачі в Державне сортовипробування.
17. Показано, що підібрані маркерні системи є ефективними для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS у сортах пшениці м'якої озимої. Встановлено, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 та PAWS5/S6 до генів, що розташовані у короткому плечі хромосоми 1R жита, дозволяє проводити

ідентифікацію пшенично-житньої транслокації та підтверджувати точність одержаних результатів незалежно від походження транслокації.

18. Вперше в Україні розроблено біотехнологію селекційного процесу, яка базується на поєднанні можливостей класичної і молекулярної генетики, з активним використанням нових мутантних генів, молекулярних маркерів, хромосомних транслокацій і штучних генетичних конструкцій. На основі найсучасніших досягнень інтрогресивної селекції, молекулярної генетики та біотехнології розроблено теоретичні основи і методи створення високопродуктивних сортів пшениці м'якої озимої, яким властиві висока якість зерна та толерантність до стресових чинників довкілля.
19. Науково обґрунтовано новий для України напрям селекції злакових культур з кольоровим зерном з метою підвищення харчової цінності зерна, що є основою для появи на продовольчому ринку нашої держави нових продуктів функціонального харчування. Для цього успішно здійснюється біофортificaція зерна шляхом селекційного привнесення в генотип рослини унікальних мутантних генів дикорослих співродичів або біотехнологічних генетичних конструкцій, спроможних радикально змінювати співвідношення компонентів крохмалю, збільшувати вміст білка і мінералів, покращувати антиоксидантну активність.
20. В результаті тривалих наукових досліджень (2006–2021 рр.) створено цінний вихідний селекційний матеріал та нові сорти-інновації різного напрямку використання. До Державних реєстрів сортів рослин, придатних для поширення в Україні, Російській Федерації та Республіці Молдова занесено 31 сорт пшениці м'якої озимої, в тому числі в Україні 29 сортів, в Російській Федерації – сорт 'Астарта', в Республіці Молдова – сорт 'Сотниця'. Дані сорти на державному рівні визнані селекційним досягненням, а їх новизна закріплена 31 авторським свідоцтвом України, Російської Федерації та Республіки Молдова.

СПИСОК ПОСИЛАНЬ

1. А.с. № 120154 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Сотниця. Автори: Артемчук І.П., Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Братущак С.П., Моргун В.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 423.
2. А.с. № 120157 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Орійка. Автори: Артемчук І.П., Моргун Б.В., Оксьом В.П., Братущак С.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 417.
3. А.с. № 140639 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Астарта. Автори: Моргун Б.В., Оксьом В.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 12.
4. А.с. № 141023 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Софія Київська. Автори: Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 260.
5. А.с. № 141024 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Покрова. Автори: Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 254.
6. А.с. № 141112 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Коляда. Автори: Артемчук І.П., Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2015. С. 374.
7. А.с. № 160512 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Новосмуглянка. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., Оксьом Л.Л., Моргун Б.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 504.
8. А.с. № 160543 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Соломія. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 511.
9. А.с. № 170768 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Бужанка. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Катеринчук О.М., Моргун Б.В., Скрипльов В.О. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 371.
10. А.с. № 170769 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.)

Бондарівна. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 370.

11. А.с. № 170770 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Зореслава. Автори : Моргун В.В., Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 385.

12. А.с. № 171137 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Стрітенська. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 343.

13. А.с. № 171138 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Боровиця. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 321.

14. А.с. № 171140 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Перлина Поділля. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Моргун Б.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 335.

15. А.с. № 171142 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Городниця. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Моргун Б.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 325.

16. А.с. № 180225 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Світогляд. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 341.

17. А.с. № 180873 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Порадниця. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 479.

18. А.с. № 180874 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Світоч. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Моргун Б.В., Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 485.

19. А.с. № 200479 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Січеслава. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 101.

20. А.с. № 200481 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Джамала. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., Моргун Б.В., Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 94.

21. А.с. № 200482 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Аміна. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., Моргун Б.В., Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 92.

22. А.с. № 200483 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Плеяда. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П., Гаврилюк М.М. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 100.

23. А.с. № 200488 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Донор Київський. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П., Починок В.М. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 104.

24. А.с. № 200788 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Академічна 100. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 250.

25. А.с. № 200789 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Світязь. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Скрипльов В.О. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 286.

26. А.с. № 200790 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Ювілейна Патона. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Скрипльов В.О. (Україна). – Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 295.

27. А.с. № 72491 Російської Федерації. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Астарта. Автори: Моргун В.В., Моргун Б.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О. (Російська Федерація). Зареєстровано в Державному реєстрі охоронних селекційних досягнень Російської Федерації, 2018.

28. А.с. № 730(3) Республіки Молдова. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Сотниця. Автори: Моргун В.В., Артемчук І.П., Братущак С.П., Моргун Б.В., Скрипльов В.О. (Республіка Молдова). Опубліковано *Soiul este inclus in Catalogul Soiurilor de Plante al Republicii Moldova in anul 2018*.

29. А.с. № 140640 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Придніпровська. Автори: Братущак С.П., Моргун В.В., Моргун Б.В., Долежан Я. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014.

С. 242.

30. А.с. № 141028 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Здоба Київська. Автори: Моргун Б.В., Оксьом Л.Л., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 236.

31. А.с. № 160548 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) Золото України. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., Моргун Б.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 502.

32. Бавол А. В., Воронова С. С., Дубровна О. В. Оптимізація умов *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсів м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2015. Т. 47, № 1. С. 58–65.

33. Бавол А. В., Моргун Б. В. Нітовська І. О., Дубровна О.В. Генетична трансформація пшениці з використанням калюсних культур, отриманих з апікальної меристеми пагона. *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*: збірник наук. праць. 2012. Т.4. С. 411-416.

34. Бавол А.В. Дубровна О.В., Гончарук О.М., Воронова С.С. *Agrobacterium*- опосередкована трансформація м'якої пшениці з використанням калюсних культур. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014, 15, С. 16–19.

35. Бавол А.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Одержання та аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці. *Biotechnologia Acta*, 2013, 6, № 6, С. 113–119.

36. Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Структура генома и хромосомный анализ растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013, Т.17, № 4/2, С. 1017-1043.

37. Власова О.М., Маринченко Л.В., Сінчук А.С. Перевірка зразків насіння кукурудзи на присутність занесених трансгенних форм, стійких до гліфосату. II міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» 19-22 вер. 2011р. Київ, 2011. С.277.

38. Власова О.М. Маринченко Л.В., О.М. Карпенко О.М. Перевірка зразків насіння кукурудзи Дніпропетровської області на присутність занесених трансгенних форм. V науково-практична конференція студентів та аспірантів Дні Науки ФБТ НТУУ «КПІ» «Біотехнологія XXI століття» 26 квіт. 2011р. Київ, 2011. С.57.

39. Воронова С.С., Бавол А.В., Дубровная О.В. Генетична трансформація *in planta* м'якої пшениці з використанням штаму AGLO, який містить рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази. *Фактори експертальної. еволюції організмів*. 2015, 17, С.126–130.

40. Воронова С.С., Гончарук О.М., Бавол А.В., Дубровная О.В. Генетическая трансформация мягкой пшеницы с использованием векторных конструкций, содержащих гены метаболизма пролина. *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2015. 13, № 1. С.28–33.

41. Воронова С. С. Бавол А. В. , Дубровна О. В. Генетична трансформація *in planta* м'якої пшениці з використанням штаму AGLO, який містить рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. Т. 15. С. 126–130.

42. Гав'яз В.О., Салашний Т.А., Великожон Л.Г., Моргун Б.В. Генотипування синтетичних ліній пшениці за генами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* запасних білків глютенінів. XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія ХХІ століття» присвячена 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (для студентів, аспірантів і молодих учених) 20.05.2020, Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського. С. 22.

43. Гончарук А.Н., Бавол А.В., Дубровная О.В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* м'якої пшениці з використанням гена орнітин амінотрансферази. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. 17. С.131–135.

44. Гончарук О. М., Бавол А.В., Дубровна О.В. Підвищення частоти регенерації калюсних культур пшениці за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2014. Т. 12, № 2. С. 159-165.

45. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Банникова М.О., Моргун Б.В. Позитивний вплив антибіотика тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. т. 17, С. 136–140.

46. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Тараненко А.М., Банникова М.О., Моргун Б.В. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка. *Физиология растений и генетика*. 2015, т. 47, № 6, С. 514–525.

47. Горбатюк І.Р., Бавол А.В., Банникова М.О., Моргун Б.В. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого

сорту Подолянка. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*. 2015, т. 24, № 1153, С. 47–53.

48. Горбатюк І.Р., Гнатюк І.С., Трояновська Л.В., Жалій Н.А., Банникова М.О., Моргун Б.В. Визначення наявності та експресії трансгенів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *Triticum aestivum* L. сортів Подолянка та Зимоярка. *Biotechnology for Agriculture and Environmental Protection: XII International Scientific-Applied Conference*. Odesa, Ukraine, September 7–10, 2016, P. 74–77.

49. Горбатюк І.Р., Щербак Н.Л., Банникова М.О., Великожон Л.Г., Кучук М.В., Моргун Б.В. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Физиология растений и генетика*. 2016, т. 48, № 1, С. 65–74.

50. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Условия, необходимые для эффективной агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens* эмбриогенного каллуса кукурузы. *Физиология растений*. 2005. т.52, № 4. С. 600-607.

51. Дубровна О.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до абіотичних стресових чинників. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку*. Київ: Логос, 2017. С.173-186.

52. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2018. 50, № 3. С.187-217.

53. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Физиология и биохимия культурных растений*, 2009, т. 41 № 6, С. 463–475.

54. Дубровна О.В., Моргун Б.В., Бавол А.В. Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія. К.: Логос, 2014. 375 с.

55. Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні основи створення рослин, стійких до стресів. Київ: Логос. 2012. 428 с.

56. Календарь Р. В., Глазко В. И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2002. Т.34, N 4. С. 279–296.

57. Кваско А.Ю., Ісаєнков С.В. Дмитрук К.В., Сибірний А.А., Блюм Я.Б., Ємець А.І. Отримання ліній пшениці (*Triticum aestivum* L.) з дріжджовими генами біосинтезу трегалози. *Цитология и генетика*, 2020, т. 54, № 4, с. 3-15

58. Кверчи М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов Сессия 7. Характеристика сои

Roundup Ready®, кукурузы MON810 и кукурузы Bt-176. М. Кверчи, М.Маццара European Commission, DJ joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg, 2006. 21 p.

59. Косаківська І.В., Васюк В.А., Войтенко Л.В., Щербатюк М.М. Регуляція гормонального балансу пшениці екзогенною абсцизовою кислотою за умов теплового стресу. *Вісник Харківського національного аграрного ун-ту. Сер. Біологія*, 2021, 1(52), с. 52-66.

60. Кунах В.А. Започаткування генетичних та генетико-селекційних досліджень в Україні (до 100-річчя від часу заснування Національної академії наук України). *Фактори експериментальної еволюції організмів* – 2018. Т. 22. С. 10-21

61. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи –К.: Логос, 2005. –730 с.

62. Кунах В.А., Твардовська М.О., Андрєєв І.О. Особливості хромосомної мінливості в культурі тканин рослин *Deschampsia antarctica* Desv. з різним числом хромосом. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. 2016, 14(1): 36–43.

63. Курочкин В.Е. Евстапов А.А., Буляница А.Л. Разработка микрочиповых устройств для проведения ПЦР в геле. *Научное приборостроение*. 2010. 20, № 4. С. 127-131.

64. Ларченко К.А., Моргун Б.В. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2010, т. 42, № 6, С. 463–474.

65. Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 2. С. 314-325.

66. Лобов В.П., М.В. Томилин М.В., Веселов А.П. Генетически модифицированные растения: достижения, перспективы и ограничения. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2010, № 2 . С. 423–429.

67. Лялько І.І., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Аналіз мейозу в сортів пшениці озимої м'якої – носіїв пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 2018, т. 16, № 2, с. 174–182.

68. Макаренко Р.А., Моргун Б.В. Клонирование и биоинформатический анализ последовательностей кДНК генов SHP малых гидрофобных белков антарктических мхов. *Вторая летняя школа по биоинформатике* (Санкт-

Петербург, 27 июля – 1 августа 2014 года). Тезисы докладов. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2014. С. 33–34.

69. Марковський О.В., Банникова М.О., Моргун Б.В. Виявлення *сгу* генів, які детермінують стійкість до комах, за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції у трансгенної кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2013. т. 12, С. 276–280.

70. Матвеева А.Ю., Корж Л.П., Христан О.О., Моргун Б.В., Тищенко Е.Н. Анализ компетенции *Agrobacterium*-опосредованной трансформации морфогенного каллуса инбредных линий кукурузы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2010. т. 9, С. 308–313.

71. Матвеева Н.А., Белокурова В.Б., Рудас В.А., Тыщенко О.В., Кучук Н.В. Сохранение и микроразмножение *in vitro* растений Антарктики. *Біотехнологія*. 2010. Т. 3, № 3, С. 23-41.

72. Михальская Л.Н., Моргун Б.В., Швартау В.В., Волков К.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Ионномика – инновационный комплексный подход к изучению ионного гомеостаза. Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», 9-12 ноября 2010 года, Москва, РФ, С. 244–245.

73. Михальська Л.М., Похилько С.Ю., Швартау В.В., Дуган О.М., Моргун Б.В. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Біологічні студії / Studia Biologica*, 2017, т. 11, № 3-4, С. 34–35

74. Михальська С.І., Комісаренко А.Г., Тищенко О.М. Розробка методів *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. 17. С.213–216.

75. Моргун Б.В. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016, т. 48, № 4, С. 324–343.

76. Моргун Б.В., Лялько І.І., Степаненко А.І., Бавол А.В., Великожон Л.Г. Цитологічна та молекулярно-генетична характеристика сортів озимої м'якої пшениці, отриманих за інтрогресивної селекції та мутагенезу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. т. 19, С. 167–171.

77. Моргун Б.В., Похилько С.Ю., Починок В.М., Дуплій В.П., Дуган О.М., Христан О.О., Степаненко А.І. Генетичне різноманіття пуринодолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* із *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Физиология растений и генетика*. 2017. т. 49, № 3, С. 229–236.

78. Моргун Б.В., Степаненко А.И., Чугункова Т.В. Молекулярно-генетический анализ сортообразцов озимой пшеницы, выращенных в различных экологических зонах Украины. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2013. т. 15, № 3(4), С. 1390–1393.

79. Моргун Б.В., Степаненко А.И., Чугункова Т.В., Лялько І.І., Степаненко О.В., Великожон Л.Г. Молекулярне визначення локалізації житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика. *Физиология растений и генетика*, 2014. т. 45, № 4, С. 319–324.

80. Моргун Б.В., Степаненко О.В., Степаненко А.І., Рибалка О.І. Молекулярно-генетична ідентифікація поліморфізму генів *Wx* у гібридах м'якої пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій. *Физиология растений и генетика*. 2015, т. 47, № 1, С. 25–35.

81. Моргун Б.В., Тищенко Е.Н. Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам. К.: Логос, 2014. – 221 с.

82. Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Лялько І.І., Великожон Л.Г., Степаненко А.І. Молекулярно-генетична ідентифікація та цитологічні особливості сортів озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2014. т. 15, С. 220–223.

83. Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Рибалка О.І., Починок В.М., Тарасюк О.І., Степаненко А.І. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці. *Физиология растений и генетика*, 2013, т. 45, № 4, С. 290–295.

84. Моргун В.В. Виступ академіка НАН України В.В.Моргун на науково-практичній конференції «День поля». *Физиология растений и генетика*. 2017. 49, № 4. С. 362-367.

85. Моргун В.В. Генетичне поліпшення рослин - основа сучасного агровиробництва. *Вісник НАН України*, 2015, № 10. С. 3–8.

86. Моргун В.В. Дубровна О.В., Моргун Б.В. Отримання стійких до стресів рослин пшениці біотехнологічними методами. *Фізіологія рослин: досягнення та нові напрямки розвитку*. Київ: Логос, 2017. С.393- 412.

87. Моргун В.В. Інноваційні здобутки Інституту фізіології рослин і генетики НАН України як вагома складова хлібного достатку нашої країни. *Фізіологія рослин і генетика*, 2020, Т.32, № 3, С. 262-276.

88. Моргун В.В. Нові сорти озимої пшениці як вагома складова хлібного достатку кпаїни. *Физиология растений и генетика*. 2019. Т.51. № 4. С. 347 – 354.

89. Моргун В.В., Дубровна О.В., Моргун Б.В. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2016. т. 48, № 3, С. 196–214.

90. Моргун В.В., Рибалка О.І. Стратегія генетичного поліпшення зернових злаків з метою забезпечення продовольчої безпеки, лікувально-профілактичного харчування та потреб переробної промисловості. *Вісник НАН України*. 2017, № 3. с. 54-64.

91. Моргун В.В., Рибалка О.І., Дубровна О.В. Генетичне поліпшення рослин: основні наукові досягнення та інноваційні розробки. *Фізіологія рослин і генетика*, 2021, т. 53, № 2, с.112-127.

92. Моргун Б.В. Молекулярні маркери як засіб вільного вибору. Abstracts of the 1st International Online Conference on “*Plant Genomics and Biotechnology*”, ІХБІГ НАН України, Kiev, Ukraine, December 23, 2013, С. 21.

93. Нитовская И.А., Абраимова О.Е., Сатарова Т.Н., Моргун Б.В. Морфология растений кукурузы, выращенных в условиях теплицы, после регенерации *in vitro*. VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Украина, 12–17 октября 2014 года, С. 44.

94. Нітовська І.О., Комарницький І.К., Моргун Б.В. Селекція на гліфосаті трансгенних калюсних ліній кукурудзи генотипів, районованих в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017, т. 20. С. 237–242.

95. Опанасенко Т.Г., Смірнова О.М., Порецька О.І., Жолнер Л.Г., Рудас В.А., Моргун Б.В., Кучук М.В. Моніторинг насіння кукурудзи зібраного в Україні па присутність трансформаційної події MON810. Друга міжнародна наукова конференція «Генетично модифіковані (біотехнологічні) рослини: перспективи використання та проблеми біобезпеки», 6-8 жовтня 2009 р., Київ, Україна.

96. Патент України на винахід № 117974. Спосіб трансформації та селекції кукурудзи /Абраімова О.Є., Нітовська І.О., Моргун Б.В., Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Деркач К.В., Сатарова Т.М. / Заявники та патентовласники Державна установа Інститут зернових культур НААН України й Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Бюл. № 20, 2018

97. Патент України на корисну модель № 61602 Спосіб визначення трансгенної лінії GA21 кукурудзи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / Моргун Б.В., Банникова М.О., Сатарова Т.М., Борисова В.В., Кучук М.В. Власник

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.07.2011, Бюл. № 14.

98. Патент України на корисну модель № 77768. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи NK603 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / Моргун Б.В., Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4.

99. Патент України на корисну модель № 77769. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи MON810 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції/ Моргун Б.В., Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4.

100. Патент України на корисну модель № 104264. Сніданок академіка Рибалки. /Рибалка О.І., Моргун Б.В., Починок В.М. заявник та патентовласник Інститут фізіології рослин та генетики НАН України. Опубліковано: 25.01.2016, Бюл. № 2.

101. Патент України на корисну модель № 115633. Спосіб отримання трансформованих рослин м'якої пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур апікального походження / Волч І.Р., Банникова М.О., Гнатюк І.С., Моргун Б.В. Заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. 19.10.2016.

102. Патент України на корисну модель № 77331. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*/ Матвєєва О.Ю., Тищенко О.М., Моргун Б.В. Власник Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. Бюл. № 3, 2013

103. Похилько С.Ю., Степаненко А.І., Дуган О.М., Моргун Б.В. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2017, т. 21, С. 168–173

104. Похилько С.Ю., Трояновська А.В., Степаненко А.І., Урбанович О.Ю., Дуган О.М., Рибалка О.І., Моргун Б.В. Дослідження генотипів пшениці м'якої з перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2016. т. 18, С. 132–136.

105. Похилько С.Ю., Швартау В.В., Починок В.М., Михальська Л.М., Дуган О.М., Моргун Б.В. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*.

Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів, 2017, т. 15, № 1, С. 52–57.

106. Решетников В.Н., Спиридович Е.В., Носов, А. . Биотехнология растений и перспективы ее развития. *Физиология растений и генетика*, 2014. 46, № 1, с. 3-18.

107. Рибалка О. І., Поліщук С. С., Кірдогло Є. К., Моргун Б.В. Генетичні та селекційні критерії створення сортів голозерного ячменю харчового напрямку. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2013. т. 45, № 3, С. 187–205.

108. Рибалка О.І., Моргун Б.В., Поліщук С.С. *Gpc-B1 (NAM-B1)* ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка в зерні та мікроелементів. *Физиология растений и генетика*. 2018, том 50, № 4, С. 279–298.

109. Рибалка О.І., Швартау В.В., Поліщук С.С., Моргун Б.В. Зниження вмісту фітатів як засіб біофортificaції ячменю за мінеральним складом зерна. *Физиология растений и генетика*. 2019, т. 51, № 2, с. 95-113

110. Рибалка О.І., Моргун Б.В., Поліщук С.С. *Ячмінь як продукт функціонального харчування*. К.: Логос, 2016. – 670 с.

111. Рибалка О.І., Моргун Б.В., Починок В.М. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків. *Физиология и биохимия культурных растений*, 2012, т. 44 № 1, С. 3–22.

112. Рибалка О.І., Моргун Б.В., Починок В.М. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2011, т. 43, № 6. С. 463–477.

113. Рибалка О.І., Моргун В.В., Моргун Б.В. Кольорове зерно пшениці і ячменю – нова стратегія селекції зернових культур із високою біологічною цінністю зерна. *Фізіологія рослин і генетика*. 2020, том 52, № 2, с. 95–127.

114. Рибалка О.І., Моргун В.В., Моргун Б.В., Поліщук С.С. Генетичні основи нового напрямку селекції оригінальних за якістю зерна класів пшениці (*Triticum aestivum* L.) і тритикале (× *Triticosecale* Wittmack). *Физиология растений и генетика*. 2019, т. 51, № 3, с. 207–240.

115. Рибалка О.І., Моргун В.В., Моргун Б.В., Починок В.М. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Физиология растений и генетика*. 2015, т. 47, № 2, С. 95–111.

116. Рибалка О.І., Червоніс М.В., Моргун Б.В., Починок В.М., Поліщук С.С. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-

дистилятного напряму технологічного використання зерна. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2013, т. 45, № 1, С. 3–19.

117. Румянцева А.Є., Савчук О.П., Макаренко Р.О., Череп М.Н., Горобець С.В., Моргун Б.В. Характеристика клонів послідовностей ДНК щучника антарктичного засобами NCBI. Тези доповідей VI Всеукраїнської науково-практичної конференції «*Біотехнологія XXI століття*» НТУУ «КПІ» - 5 квітня 2012 року - С. 99-100.

118. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. *Вариабельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений*. – Одеса: Астропринт, 2011. – 340 с.

119. Смарагдов М.Г. Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции. *Генетика*. 2009. Т. 45, С. 725–728.

120. Степаненко А.И., Моргун Б.В., Починок В.М. Скрининг селекционных образцов пшеницы на наличие аллеля *al* локуса *Glu-B1*. Сборник тезисов XII Молодёжной научной конференции «*Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии*», Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 11 апреля 2012, С. 64–65.

121. Степаненко А.И., Моргун Б.В., Рыбалка А.И. Молекулярные маркеры для детектирования в пшенице QTL *Gpc-B1*, перенесенного от *T. dicoccoides*. Сборник тезисов XIV Молодёжной научной конференции «*Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии*», Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 16 апреля 2014, с. 50–52.

122. Степаненко А.І., Благодарова О.М., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Рибалка О.І. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 2014, т. 12, № 1, С. 78–83.

123. Степаненко А.І., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Адаменко Н.І., Великожон Л.Г. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, т. 10, № 2, 2012, С. 311–318.

124. Степаненко А.І., Степаненко О.В., Моргун Б.В. Поліморфізм генів пшениці, які визначають якісні ознаки, у харчових продуктах. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2015. 16, С. 161–165.

125. Степаненко А.І., Трояновська А.В., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Великожон Л.Г., Рибалка О.І., Поліщук С.С. Маркерний аналіз генів поліфенолоксидази (РРО) у сортах м'якої пшениці. *Физиология растений и генетика*. 2014, т. 45, № 6, С. 490–497.

126. Степаненко Е.В., Степаненко А.И., Моргун Б.В., Рыбалка А.И., Кузьминский Е.В. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. *Вестник Южно-Казахстанской государственной фармацевтической академии*. 2016. № 4(77), С. 29–31.

127. Степаненко Е.В., Степаненко А.И., Моргун Б.В., Рыбалка А.И., Кузьминский Е.В. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. IV международная научная конференция молодых ученых и студентов «*Перспективы развития биологии, медицины и фармации*» 9-10 ноября 2016 года (г. Шымкент, Республика Казахстан).

128. Степаненко О.В., Моргун Б.В., Рибалка О.І., Степаненко А.І., Кузьмінський Є.В. Виявлення алельних варіантів гену *wax* серед вітчизняних і зарубіжних сортів ячменю. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*, 2014, № 3(95), С. 78–83.

129. Степаненко О.В., Музафарова В.А., Степаненко А.І., Кузьмінський Є.В., Рябчун В.К., Моргун Б.В. Комплексна молекулярно-генетична оцінка генофонду ячменю ярого за напрямками використання. *Физиология растений и генетика*. 2017. т. 49. № 4, С. 328–338.

130. Степаненко О.В., Рибалка О.І., Степаненко А.І., Моргун Б.В. Розробка низхідної ПЛР для визначення алельних варіантів гену *Wax* ячменю. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «*Проблемы и перспективы исследований растительного мира*», Нікітський ботанічний сад – ННЦ НААН України, Ялта, Україна, 13-16 травня 2014 року, С. 67–68.

131. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения. *Успехи современной биологии*. 2004. Т. 124, С. 260–271.

132. Тищенко Е.Н., Моргун Б.В. Генетическая инженерия по повышению осмотолерантности культурных злаковых растений с использованием генов транскрипционных факторов DREB и AREB/ABF. *Физиология растений и генетика*. 2015, т. 47, № 5, С. 371–392.

133. Тищенко Е.Н., Моргун Б.В. Экспрессия трансгенов, проблемы и стратегии для практического применения. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2004. Т.36, № 4. С. 279-290.

134. Топчий Т.В., Починок В.М., Моргун Б.В. Стійкість ліній озимої пшениці, створених способом віддаленої гібридизації, до комплексу хвороб та шкідників. *Физиология растений и генетика*. 2014, т. 46, № 3, С. 230–235.

135. Трояновская А.В., Похилько С.Ю., Моргун Б.В., Степаненко А.И., Рыбалка А.И., Полищук С.С., Починок В.М. Определение ценных алелей гена *Grs-B1* в генотипах мягкой пшеницы. Материалы II международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» г. Минск, 13-16 октября 2015 года / Ред. колл.: А.В. Кильчевский и др.; Институт генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск, 2015 г. С. 128.

136. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17, № 4/2. С. 1044-1054.

137. Хлесткина Е.К. Молекулярные методы анализа структурно-функциональной организации генов и геномов высших растений. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2011. Т. 15, № 4. С. 757-768.

138. Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы. *Генетика*. 2006. Т. 42. С. 725-736.

139. Чумаков М. И. Моисеева Е.М. Технологии агробактериальной трансформации растений in planta. *Биотехнология*. 2012. № 1. С. 8–20.

140. Aadel H., Udupa S., Abdelwahd R., Gaboun F., Diria G., Douira A., Iraqi D. Agrobacterium-mediated genetic transformation of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using immature embryos. *Romanian agricultural research*, No. 38, 2021 www.incda-fundulea.ro First Online.

141. Abadi M.A. Development and application of novel genetic transformation technologies in maize (*Zea mays* L.): Dissertation, Tabriz . Iran, 2007. 112 p.

142. Abebe T., Guenzi A., Martin B., Cushman J. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiology*. 2003. 131, N 4. P. 1748-1755.

143. Abid N., Maqbool A., Malik.K. Screening commercial wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties for Agrobacterium mediated transformation ability. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. -2014.- 51, N1. - P. 83–89.

144. Abraimova, O.E., Satarova, T.M., Morgun, B.V., Nitovska I.O., Derkach, K.V., Cherenkov, A.V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. *Proceeding of 57th Annual Maize Genetics Conference*, March 12–15, 2015, Pheasant Run, St. Charles, Illinois, USA, P. 140.

145. Agarwal S. et al. Floral transformation of wheat. *Methods in Molecular Biology*. Transgenic Wheat, Barley and Oats. 2009. Vol. 478. P. 105–113.
146. Alberdi M., Bravo L. A., Gutierrez A., Gidekel M., Corcuera L. J. Ecophysiology of Antarctic vascular plants. *Physioljgy Plant*. 2002; 115(4):479-486.
147. Alder, M. N., Dames, S., Gaudet, J., and Mango, S. E. Gene silencing in *Caenorhabditis elegans* by transitive RNA interference, *RNA*, 2003, 9, pp. 25-32.
148. Altpeter F., Vasil V., Srivastava V., Vasil I. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit *1Ax1* gene into wheat. *Nature Biotechnology*. 1996. 14. P.1155–1159.
149. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25. P.3389-3402.
150. Amoah B., Wu H., Sparksand C., Jones H. Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*. 2001. 52. P.1135–1142.
151. Andersen J.R., Lübberstedt T. Functional markers in plants. *Trends Plant Science*. 2003. Vol. 8. P. 554-560.
152. Anderson J., Li Qin-Bao, Haskel D., Spinach BiP and an HSP 70 are differently regulated during cold acclimation. *Plant Physiology* 1993. V. 102, N. 1. Suppl. P. 149
153. Anwar A., She M., Wang K. Cloning and molecular characterization of *Triticum aestivum* ornithineaminotransferase (TaOAT) encoding genes. *BMC Plant Biol.*, 2020, 20, pp. 187- 207.
154. Anwar A., She, M., Wang K., Riaz B., Ye X. Biological Roles of Ornithine Aminotransferase (OAT) in Plant Stress Tolerance: Present Progress and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. 19. 3681. 10.3390/ijms19113681
155. Arnholdt-Schmitt B. Functional markers and a “systemic strategy”: convergency between plant breeding, plant nutrition and molecular biology. *Plant Physiol Bioch*. 2005. Vol. 43. P. 817-820.
156. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 2003. – pp. 1600.
157. Backert S., Dorfel P., Lurz., Borner T. Rolling-circle replication of mitochondrial DNA in higher plant *Chrnopodium album* L. *Molecular Cell Bioljgy*. 1996. V. 16, N. 11. P. 6285-6294.

158. Backert S., Nielsen B.L., Borner T. The mystery of rings: structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends Genetics*. 1997. V. 2, N. 12. P. 477-483.
159. Baga M., Nair R., Repellin A., Scoles G., Chibbar R. Isolation of a cDNA encoding a granule-bound 152-kilodalton starch-branching enzyme in wheat. *Plant Physiology*. 2000. 124. P.253–264.
160. Basu S.K., Datta M., Sharaia M. Haploid production technology in wheat and some selected higher plants. *Australian Journal Crop Science*. 2011. Vol. 5. P. 1087-1093.
161. Ben-Saad R., Ben-Ramdhan W., Zouari N. Marker-free transgenic durum wheat cv. Karim expressing the *ALSAP* gene exhibits a high level of tolerance to salinity and dehydration stresses. *Molecular Breeding*. 2012. 30, N 1. P. 521–533.
162. Bhalla P., Ottenhof H., Singh M. Wheat transformation an update of recent progress. *Euphytica*. 2006. 149. P. 353-366.
163. Bhatt A.M., Lister C., Crawford N., Dean C. The transposition frequency of *Tag1* elements is increased in transgenic *Arabidopsis* lines. *Plant Cell*. 1998. V.10. P. 427–434.
164. Bieri S., Potrykus I., Fütterer J. Expression of active barley seed ribosome-inactivating protein in transgenic wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000. 100. P.755–763.
165. Binka A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. The *Agrobacterium*-mediated transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) and triticale (x *Triticosecale* Wittmack): role of the binary vector system and selection cassettes. *Journal Applied Genetics*. 2012. Vol. 53. P. 1–8.
166. Borisjuk N., Shi J., Bi H., Peterson A., Chen C., Shavrukov Y., Stepanenko A., Morgun B., Utebayev M., Hrmova M., Lopato S. Diversity of grain and leaf surface aliphatic components in wheat. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018.
167. Borisjuk, N., Kishchenko, O., Eliby, S., Schramm, C., Anderson, P., Jatayev, S., Kurishbayev, A. & Shavrukov Y. Genetic modification for wheat improvement: from transgenesis to genome editing. *BioMed Research International. Article*, 2019, ID 6216304, 18 pages <https://doi.org/10.1155/2019/6216304>
168. Bornet B., Branchard M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biol. Rep.* 2012. Vol. 19. P. 209-215.

169. Box M.S., Coustham V., Dean C., Mylne J.S. Protocol: A simple phenol-based method for 96-well extraction of high quality RNA from *Arabidopsis*. *Plant Methods*. 2011, 7:7.
170. Brinch-Pederson H., Oleson A., Rasmussen S., Holm P. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus* phytase. *Molecular Breeding*. 2000. 6. P.195–206.
171. Bublyk, O., Andreev, I., Parnikoza, I., Kunakh, V. Population genetic structure of *iris pumila* L. In Ukraine: Effects of habitat fragmentation. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 2020, 62(1), pp. 51-61.
172. Buziashvili A., Cherednichenko L., Kropyvko S., Blume Ya., Yemets A. Obtaining Transgenic Potato Plants Expressing the Human Lactoferrin Gene and Analysis of Their Resistance to Phytopathogens. *Cytology and Genetics*. 2020, 54 (5), pp. 179-188.
173. Carena M.J. Maize commercial hybrids compared to improved population hybrids for grain yield and agronomic performance. *Euphytica*. 2005. Vol. 141. P. 201-208
174. Casacuberta, J.M. and Santiago, N. Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes, *Gene*, 2003, no 311, pp. 1-11.
175. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems. *Transgenic Research*. 1992. 1. P.93 –100.
176. Chen G., Michael T., Stepanenko A., Zhou Yu., Peterson A., Kishchenko O., Cui D., Zhu H., Lakhneko O., Morgun B., Lam E., Borisjuk N. Special arrangement of 5S rDNA in great duckweed, *Spirodela polyrhiza*: unusually low gene copy number, sequence divergence and precise chromosomal arrangement. *5th International ICDRA Conference on Duckweed Research and Applications*. Weizmann Institute of Science. Rehovot, Israel. September 9-12, 2019. P. 59.
177. Chen G., Michael T., Zhou Yu., Stepanenko A., Peterson A., Kishchenko O., Lakhneko O., Morgun B., Lam E., Borisjuk N. Duckweed rDNA organization and evolution. PAG XXVII - *Plant & Animal Genome Conference*. San Diego, USA, January 2019.
178. Chen Q., Xie M., Ma X., Dong L., Chen J., Wang X. MISSA is a highly efficient in vivo DNA assembly method for plant multiple-gene transformation. *Plant Physiology*. 2010. 153. P. 41–50.

179. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Hironaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*. 1997. 115. P. 971-980.
180. Cheng M. Desiccation of plant tissues post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cellular Developmental Bioljgy. Plant*. 2003. Vol. 39. P. 595–604.
181. Cheng M. Invited Review: Factors Influencing *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Monocotyledonous Species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 2004. Vol. 40. № 1. P. 31–45.
182. Cheng Z. Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*. 1998. Vol. 17. P. 646–649.
183. Chien-Yuan K., Shin-Hui H., Chiu-Mei L. A low-pressure gene gun for genetic transformation of maize (*Zea mays L.*) *Plant Biotechnology Reports*. 2008. Vol. 2. P. 267-270.
184. Chien K., Shin H., Chiu L. A low-pressure gene gun for genetic transformation of maize (*Zea mays L.*). *Plant Biotechnology Reports*. 2008. Vol. 2. P. 267-270.
185. Choi H.W, Lemaux P.G. and Cho M.-J. Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare L.*) plants, *Crop Science*, 2000, no 40, pp. 524–533.
186. Choi H.W., Lemaux P.G. and Cho, M.-J. High frequency of cytogenetic aberration in transgenic oat (*Avena sativa L.*) plants, *Plant Science*, 2001, no 160, pp. 763-772.
187. Choulet F., Wicker T., Rustenholz C. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell*. 2010. V.22, N. 6. P. 1686–1701.
188. Choulet, F., Wicker, T., Rustenholz, C., Paux, E., Salse, J., Leroy, P., Schlub, S., Le Paslier, M., Magdelenat, G., Gonthier, C., Couloux, A., Budak, H., Breen, J., Pumphrey, M., Liu, S., Kong, X., Jia, J., Gut, M., Brunel, D., Anderson, J., Gill, B., Appels, R., Keller, B. and Feuillet, C. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces, *Plant Cell*, 2010, vol. 22, no 6, pp. 1686-1701.
189. Chugh A., Khurana P. Herbicide-resistant transgenics of bread wheat (*T. aestivum*) and emmer wheat (*T. dicoccum*) by particle bombardment and *Agrobacterium* mediated approaches. *Current Science*.2003.84. P. 78-83.

190. Chunmei H., Ying H., Qiang L., Tieshan L., Chunxiao L., Liming W., Juren Z. Co-expression of genes *ApGSMT2* and *ApDMT2* for glycinebetaine synthesis in maize enhances the drought tolerance of plants. *Molecular Breeding*. 2013. Vol. 31. P. 559-573.
191. Clausen M., Krauter, R., Schachermayr G., Potrykus I., Sautter C. Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat. *Nature Biotechnology*. 2000. 18 . P. 446-449.
192. Clemente T., Mitra A. Genetic engineering of wheat: protocols and use to enhance stress tolerance. Genetically modified crops: their development, uses, and risks. – Haworth Press, New York. P. 131-163.
193. Cong L., Wang C., Chen L., Liu H., Yang G., He G. Expression of phytoene synthase1 and carotene desaturase *crtI* genes result in an increase in the total carotenoids content in transgenic elite wheat (*Triticum aestivum* L.). *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 57. P 8652 –8660.
194. Costa M. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports*. 2000. Vol. 19. P. 327-332.
195. Curtis I. S., Nam H. G. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. Longipinnatus Bailey) byfloral-dipmethod – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Transgenic Research*. 2001. V. 10. P. 363–371.
196. D'Halluin K., Bonne E., Bossut M., De Beuckeleer M., Leemans J. Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. *The Plant Cell*. 1992. 4. P. 1495-1505.
197. Danilova S.A., Kusnetsov V.V., Dolgikh Yu.I. A novel efficient method for maize genetic transformation: Usage of agrobacterial monolayer. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2009. Vol. 56. P. 258-263
198. Danilova S. Dolgikh Y. The stimulatory effect of the antibiotic Cefotaxime on plant regeneration in maize tissue culture. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2004. Vol. 51 No. 4 P 559–562.
199. De Block M., Debrouwer D., Moens T. The development of a nuclear male sterility system in wheat. Expression of the barnase gene under the control of tapetum specific promoters. *Theoretical and Applied Genetics*. 1997. 95. P. 125-131
200. Delannay X., McLaren G., Ribaut J-M. Fostering molecular breeding in developing countries. *Mol. Breed*. 2012. Vol. 29. P. 857-873.

201. Ding L., Li S., Gao J., Wang Y., Yang G., He G. Optimization of *Agrobacterium* mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reports*. 2009. 36. P. 29-36.
202. Dokumbo E., Housman D.I., Zubaru A. *Agrobacterium* change: A help to farming biotechnology. *International Journal of Genetics and Genomics*. 2015. – Vol. 2. – P. 109–112.
203. Dorota K., Greg C., Grazyna G., Janusz D., Krzysztof F., Araceli C., Bartłomiej F., Stanley R., Jacek H. The Role of Annexin in Drought Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2009. Vol. 150, P. 1394-1410.
204. Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R. Plant Genetic Transformation and Gene Expression – A Laboratory Manual – Blackwell, Oxford. – 1988. – 355 p.
205. Duncan D.R., Widholm J.M. Improved plant regeneration from maize callus cultures using 6-benzylaminopurine. *Plant Cell Reports*. 1988. 7. P. 452-455.
206. Enikeev, A.G., Kopytina, T.V., Semenova, L.A., Natyaganova, A.V., Gamanetz, L.V. and Volkova, O.D. *Agrobacterium* transformation as complex biotical stressing factor. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 2008, vol. 4, no 1, pp. 11-19.
207. Enriquez-Obregon G. A. et al. *Agrobacterium*-mediated Japonica rice transformation a procedure assisted by an antinecrotic treatment. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 1999. Vol. 59. P. 159–168.
208. European Cereals Genetics Co-operation Newsletter. *Proc. Of the 15th International EWAC Conference* / Eds A. Börner, B. Kobijlski. Novi Sad, Serbia. 2012. 204 p.
209. Falke K.C., Miedaner T., Frisch M. Selection strategies for the development of rye introgression libraries. *Theoretical Appl. Genet.* 2009. Vol. 119. P. 595-603.
210. Farzaneh A. Determine effective concentrations of β -lactam antibiotics against three strains of *Agrobacterium tumefaciens* and phytotoxicity on Tomato and Tobacco. *International Journal of Agronomy and Plant Production*. 2013. Vol. 4. P. 2919–2925.
211. Fedorenko, T., Markovskiy, O., Vlasova, O., Bannikova, M., Kuchuk, M., Morgun, B. Detection of Resistant to Glyphosate Maize Transformation Events GA21, MON88017 and NK603 among Ukrainian Market Samples. *World Congress on In Vitro Biology*, Washington, USA, June 3-7, 2012, P-2057.
212. Fennel A., Hauptmann R. Electroporation and PEG delivery of DNA into maize microspores. *Plant Cell Reports*. 1992. 11. P. 567-570.

213. Flugge, U.I., Klosgen, R.B. Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor at Toc33 from chloroplasts, *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, vol. 272, no 4, pp. 379-396.
214. Frame B.R., Shou H., Chikwamba R.K. *Agrobacterium tumerfaciens* - Mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology*. 2002. Vol. 129. P. 13-22.
215. Frame B., Main M., Schick R., Wang K. Genetic transformation using maize immature zygotic embryos / Thorpe T.A., Yeung E.C. (eds) *Plant Embryo Culture. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. - Springer Science Business Media. 2011. - Vol. 710. - P. 327-341.
216. Franz P. F., Schel J. H. N. Cytodifferentiation during the development of friable embryogenesis callus in maize (*Zea mays*). *Can. Journal of Botany*. 1990. 69. P. 26-33.
217. Gao X, Zhang L, Zhou S. AtMYB12 gene: a novel visible marker for wheat transformation. *Molecular Biology Reports*. 2011. 38. P. 183-190.
218. Gaspar, Y., Nam, J., Schultz, C., Lee, L., Gilson, P., Gelvin, S. and Bacic, A. Characterization of the Arabidopsis lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (rat1) that results in a decreased efficiency of *Agrobacterium* transformation, *Plant Physiology*, 2004, vol. 135, no 4, pp. 2162-2171.
219. Gelvin S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* - 2000. - Vol. 51. - P. 223-256.
220. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-Mediated plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2003. - P. 16-37.
221. Gill K., Lubbers E., Gill B., Raupp W., Cox T.A. Genetic map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat. *Genome*. 1991. Vol. 34. P. 362-374.
222. Gorbatyuk I.R., Bavol A.V., Holubenko A.V., Morgun B.V. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka. *Biotechnologia Acta*. 2015, V. 8, No. 1, P. 56–62.
223. Green J.M. The benefits of herbicide-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 2012. V. 68, N 10. P.1323-1331.
224. Grewal D. Influence of antibiotic cefotaxime on somatic embryogenesis and plant regeneration in indica rice. *Biotechnology Journal*. 2006. Vol. 1. P. 1158 –1162.

225. Grzebelus E., Skop L. Effect of β -lactam antibiotics on plant regeneration in carrot protoplast cultures. *In Vitro Cell Development Biology*. 2014. Vol. 50. P. 568–575.
226. Gupta P.K. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomics*. 2004. Vol. 4. P. 139-162.
227. Gvozdev V.A. Mobile genes and RNA interference, *Genetics*, 2003, 39, pp. 151-156.
228. Haddadi F. An efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of strawberry cv. Camarosa by a dual plasmid system. *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 3647–3666.
229. Han S., Oh P., Kim H., Heo H., Moon J., Lee S., Kim K., Seo Y., Le B. Effects of antibiotics on suppression of *Agrobacterium tumefaciens* and plant regeneration from wheat embryo. *Jornal Crop Science and Biotechnology* 2007. Vol. 10. P. 92–98.
230. Hansen G. Evidence for *Agrobacterium*-Induced Apoptosis in Maize Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*. 2000. 13, № 6. P. 649-657.
231. He C., Zhang W., Gao Q. Enhancement of drought resistance and biomass by increasing the amount of glycine betaine in wheat seedling. *Euphytica*. 2011. 177, N 2. P.151–167.
232. He G., Rooke L., Steele S., Bekes F., Gras P., Tatham A., Fido R., Barcelo P., Shewry P., Lazzeri P. Transformation of pasta wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) with high-molecular weight glutenin subunit genes and modification of dough functionality. *Molecular Breeding*.1999. 5, P. 377-386.
233. He Y., Jones H., Chen S. *Agrobacterium*-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum* cv Stewart) with improved efficiency. *Jornal of Experimental Botany*. 2010. 61. P. 1567-1581.
234. Herzog E., Frisch M. Selection strategies for marker-assisted backcrossing with high-throughput marker systems. *Theoretical and Applied. Genetics*. 2011. Vol. 123. P. 251-260.
235. Hess D, Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelets of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*.1990. 72. P. 233-244.
236. Hiei Y., Ishida Y., Komari T. Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*. 2014. 5. P. 1–11.
237. Hsu P., Lander E., Zhang F. Development and application of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157 (6), pp. 1262-1278.

238. Hu T. *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*. 2003. Vol. 21. P. 1010–1019.
239. Huang X.Q., Cloutier S. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. *BMC Genetics*. 2007. Режим доступу до журн. : <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/8/18>
240. Huijun Zh., Hezhong D., Weijiang L., Yi S., Shouyi Ch., Xiangqiang K. Increased glycine betaine synthesis and salinity tolerance in AhCMO transgenic cotton lines. *Molecular Breeding*. 2009. Vol. 23. P. 289-298.
241. Ishchenko O.O., Panchuk I.I., Andreev I.O., Kunakh V.A., Volkov R.A. Molecular Organization of 5S Ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytology and Genetics*, 2018, 52 (6), 416-421
242. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature protocols*. - 2007. - Vol. 2. -P. 1614-1621.
243. Ishida Y., Saito h., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology*. 1996. Vol. 14. -P. 745-750.
244. Ivanovych Y., Volkov R. Genetic relatedness of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars from Ukraine determined by microsatellite markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2018 ,93 (1), pp.64-72.
245. Jasdeep C.P., Avijit T. Genetic Transformation and Transgenic Wheat Development: *An Overview Clon Transgen*, 2015, 5:10.
246. Jones H., Doherty A., Wu H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium* mediated transformation of wheat. *Plant Methods*. 2005. 1. P.1- 5.
247. Jorg R., Anthony S., George K. Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. *Progress in Biological Control*. 2008. Vol. 5. P. 1-26.
248. Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H.N. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*. 2011. Vol. 106. P. 520-530.
249. Kalendar, R. and Schulman, A. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting, *Nature Protocols*, 2006, vol. 1, no 5, pp. 2478-2484.

250. Kaya, Y., Yilmaz, S., Gozukirmizi, N. and Huyop, F. Evaluation of transgenic *Nicotiana tabacum* with *dehE* gene using transposon based IRAP markers, *American Journal of Plant Sciences*, 2013, vol. 4, no 8A, pp. 41-44.
251. Kazemi E. Reduction of negative effects of Cefotaxime in tomato transformation by using FeEDDHA. *International Journal of Farming and Allied Sciences*. 2014. Vol. 3. P. 538–542.
252. Khanna H., Daggard G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a superbinary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium. *Plant Cell Reports*. 2003. 21. P. 429–436.
253. Kidwell, M.G. Lisch, D.R. Transposable elements and host genome evolution, *Trends Ecology Evol.*, 2000, no 15, pp. 95-99.
254. Kosakivska I.V., Vasyuk V.A., Voytenko L.V. Effects of exogenous abscisic acid on seed germination and morphological characteristics of two related wheats *Triticum aestivum* L. and *Triticum spelta* L. *Fiziol. rast. Genet*, 2019, 51, 55-66.
255. Kovtun Y., Chiu W.L., Tena G., Sheen J. Functional analysis of oxidative stress activated mitogen activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. - 2000. - Vol. 97. - P. 2940-2945.
256. Kranz E., Lorz H. *In vitro* fertilization of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. *Zygote*. 1994. Vol. 2. P. 125-128.
257. Kroemer, K., Reski, R., Frank, W. Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants. *Plant Cell Reports*. 2004; 22(11):864-70.
258. Kuchuk N.V. Cell genetic engineering: Transmission genetics of plants. *Cytology and Genetics*, 2017 , 51 (2), 103-107.
259. Kumar A. M. Towards crop improvement in bell pepper (*Capsicum annuum* L.): transgenics (uid A::hptII) by a tissue culture independent *Agrobacterium*-mediated *in planta* approach. *Scientia Horticulturae*. 2009. Vol. 119. P. 362–370.
260. Kumlehn J. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen culture with *Agrobacterium tumefaciens* . *Plant Biotechnology Journal*. 2006. Vol. 4. P. 251–258.
261. Labra, M., Savini, C., Bracale M., Pelucchi, N., Colombo L., Bardini, M. and Sala, F. Genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced by infecting calli with *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Cell Reports*, 2001, no 20, pp. 325-330.

262. Lakhneko O., Danchenko M., Morgun B., Kováč A., Majerová P., Škultéty L. Comprehensive comparison of clinically relevant grain proteins in modern and traditional bread wheat cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, Vol. 21, No. 10, pp. 3445(1-21)
263. Lakhneko O., Morgun B., Skultety L., Danchenko M. Comparative proteomics of grain allergens from several wheat varieties. The 3rd International Plant Proteomic Organization (INPPO) World Congress, Padova, Italy, September 9-12, 2018. – P. 62.
264. Christensen, A.H., Quail, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 1996, 5, 213–218.
265. Stewart C., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*. 1993;14:748–751.
266. Lakhneko O.R., Morgun B.V., Kalendar R.M., Stepanenko A.I., Troianovska A.V., Rybalka O.I. SSR analysis in the study of genetic diversity and similarity of barley cultivars. *Biotechnologia Acta*. 2016, V. 9, No. 3, P. 61–68.
267. Landjeva S., Korzun V., Borner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphitica*. 2007. Vol. 156. P. 271-296.
268. Langridge P., Brettschneider R., Lazzeri P., Lörz H. Transformation of cereals *via Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment. *Plant Journal*. 2002. 2. P. 631-638.
269. Leckband G., Lorz H. Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998. 96. P.1004–1012.
270. Leonard J.M., Bollmann, S.R. and Hays, J.B. Reduction of stability of Arabidopsis genomic and transgenic DNA-repeat sequences (microsatellites) by inactivation of AtMSH2 mismatch-repair function, *Plant Physiology*, 2003, vol. 133, no. 1, pp. 328-338.
271. Li J., Zhao W., Li O. RNA silencing of Waxy gene results in low levels of amylose in the seeds of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Acta Genetica Sinica*. 2005. 32. P. 846-854.
272. Li W. Establishment of the genetic transformation system of *Limonium sinense* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*. 2008. Vol. 7. P. 2668–2669.

273. Lilius G., Holmberg N., Bulow L. Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Biotechnology*. 1996. Vol. 14. P. 177-180.
274. Lin J., Assad-Garcia N., Kuo J. Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cells. *Plant Science*. 1995. Vol. 109. P. 171–177.
275. Ling H., Kriseleit D., Ganai M. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Reports*. 1998. Vol. 17. P.843–847.
276. Lipp J. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1Rif^r: pGSFRll61 in the presence of acetosyringone. *Plant Cell Reports*. 1993. Vol.12. P. 422–425.
277. Lister R., O'Malley R., Tonti-Filippini J., Gregory B., Berry C., Miller, A. and Ecker, J. Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*, *Cell*, 2008, no 133, pp. 523-536.
278. Lonsdale D., Lindup S., Moisan L., Harvey A. Using firefly luciferase to identify the transition from transient to stable expression in bombarded wheat scutellar tissue. *Physiologia Plantarum*.1998. 102. P.447-453.
279. Lu C., Vasil V., Vasil I. K. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 1983 . 66. P. 285-289.
280. Lupotto E., Conti E., Reali A., L Lanzanova C., Baldoni E., Allegri L. Improving *in vitro* culture and regeneration conditions for *Agrobacterium*-mediated maize transformation. *Maydica*, 2004, 49: 21-29.
281. Lyznik L.A., Ryan R.D., S.W. Ritchie, T.K. Hodges. Stable co-transformation of maize protoplasts with gusA and neo genes. *Plant Molecular Biology*. 1989. 13. P. 151-161.
282. Maas C., Werr W. Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts. *Plant Cell Reports*. 1989. 8. P. 292-295.
283. Machuka J., Oduor R., Runo S., Rasha A., Matheka J., Bedada L., Seth M., Kuria E., Masiga C., Mugoya C. Genetic engineering of maize for drought tolerance in Eastern and Central Africa. *Agricultural Research in Eastern and Central Africa - ASARECA*. - 2015. - P. 1-9.
284. Mahalakshmi A., Khurana P. *Agrobacterium*- Mediated Gene Delivery in Various Tissues and Genotypes of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Biochemistry and Biotechnology*.1995. 4, N2. P. 55-59.

285. Makarenko R., Savchuk O., Rumianceva A., Ivashchuk B., Cherep M., Gorobec S., Morgun B. Cloning and molecular-genetic analysis *Deschampsia antarctica* mitochondrial sequences. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія*. Вип. 2(64). 2013, P. 45–47.
286. Makarenko R.O., Savchuk O.P., Cherep M.N., Morgun B.V. Cloning and molecular genetic analyses of *Deschampsia antarctica* mitochondrial DNA sequences. *Conference Proceedings. Cell Technology Week*. Kiev, Ukraine, 14-17 May 2013, P. 52.
287. Makarova Yu., Cramers D. Noncoding RNA, *Biochemistry*, 2007, vol. 72, No. 11, pp. 1427-1448.
288. Mamidala P., Nanna R. Influence of antibiotics on regeneration efficiency in tomato. *Plant Omics Journal*. 2009. Vol. 2. P. 135–140.
289. Mamrutha H. M. Genetic transformation of wheat–Present status and future potential. *Journal of Wheat Research*. 2014. Vol. 6. P. 107–119.
290. Marone D., Laido G., Gadaleta A. A high-density consensus map of A and B wheat genomes. *Theoretical and Applied Genetics*. 2012. Vol. 125. P. 1619-1638.
291. Martienssen, R. A., and Colot, V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi, *Science*, 2001, vol. 293, pp. 1070-1074.
292. Massimo M., Fabio F., Virgilio B., Giovanna D., Laurence S., Luciana C., Mario M. Tolerance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* AG4 of transgenic tobacco expressing the maize ribosome-inactivating protein b-32. *Transgenic Research*. 2011. Vol. 6. P. 393-402.
293. Mattana M., Biazzi E., Consonni R. Overexpression of Osmyb4 enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Physiology Plant*. 2005. Vol. 125. P. 212-223.
294. Matvieieva N. A., Kvasko O. Yu., Duplij V.P., Luchakivska Yu.S., Drobot K.S., Kuchuk M. V. Comparison of salt stress tolerance of Antarctic mosses. *Ecological Engineering and Environment Protection*. 2013. No. 2, P. 30-38.
295. Matzke A.J.M. and Matzke M.A. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, no 1, pp. 142-148.
296. Matzke M.A., Mette M.F. and Matzke A.J.M. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates, *Plant Molecular Biology*, 2000, no 43, pp. 401-415.
297. McCormac A., Wu H., Bao M. The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated t-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica*. 1998. 99. P. 17-25.

298. Meister, G., and Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA, *Nature*, 2004, 431, pp. 343-349.
299. Mello C. C. and Conte D., Jr. Revealing the world of RNA interference, *Nature*, 2004, 431, pp. 338-342.
300. Mendes A. F. Evaluation of novel beta-lactam antibiotics in comparison. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 2009. Vol. 97. P. 331–336.
301. Milligan A., Daly A., Parry M., Lazzeri P., Jepson I. The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and in vitro. *Molecular Breeding*. 2012. Vol. 7. P. 301-315.
302. Mitić N., Nikolić R., Ninković S. *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration of *Triticum Aestivum* L. *Biologia Plantarum*. 1998. 48. P. 179-184.
303. Mitic' N., Nikolić R., Ninković S. The procedure providing enhanced *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat. *Biologia*. 2014. Vol. 69. P. 1668–1677.
304. Moiseeva Y. M. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an *in planta* method. *British Biotechnology Journal*. 2014. Vol. 4. № 2. P. 116–125.
305. Mooney P., Goodwin P., Dennis E., Lewelley D. *Agrobacterium tumefaciens*-gene transfer into wheat tissues. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 1991. 25. P. 209-218.
306. Morgun B.V., Dubrovna O.V. IRAP analysis of transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*. 2019, vol. 53, no. 5, pp. 384–391.
307. Muhammad A., Muhammad A.M., Rahime C. Global Achievements in Drought Tolerance of Maize. *Plant Breeding and Genetics*. 2015. P. 37-43.
308. Muller, K., Heller, H. and Doerfner, W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes, *Journal Biological Chemistry*, 2001, no 276, pp. 14271-14278.
309. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 1962. V.117, № 2. P. 109-117.
310. Myeong J., Emily I., Jackie K., Maryanne Y., Jenny B., Wutt L. *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Reports*. 2014. Vol. 33. P. 1767-1777.

311. Naqvi S., Farre G., Sanahuja G., Capell T., Zhu C., Christou P. When more is better: multigene engineering in plants. *Trends Plant Science*. 2010. 15. P. 48–56.
312. National Center for Biotechnology Information, GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
313. Nauerby B. Influence of the antibiotic Timentin on plant regeneration compared to Carbenicillin and Cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*. 1997. Vol. 123. P. 169–177.
314. Ning L., Feng G., Aifang Y., Juren Z. Over-expression of TsCBFI gene confers improved drought tolerance in transgenic maize. *Molecular Breeding*. 2010. V. 26. P. 455-465.
315. Nitovska I., Komarnytsky I., Abraimova O., Satarova T., Morgun B. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize of Ukrainian breeding genotypes. *Abstracts of International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology*, Lviv, Ukraine, October 11-13, 2015, P. 44.
316. Nitovska I.O., Abraimova O.Y., Duplij V.P., Derkach K.V., Satarova T.M., Rudas V.A., Cherchel V.Yu., Dziubetskyi B.V., Morgun B.V. Application of beta-glucuronidase transient expression for selection of maize genotypes competent for genetic transformation. *Cytology and Genetics*. 2019, vol. 53, no. 6, pp. 451–458.
317. Nitovska I.O., Vasylenko M.Yu., Morgun B.V. Investigation of monocotyledon introns influence on the expression of transgenes in dicotyledonous plants in the genus *Nicotiana*. *Biotechnology Acta*, 2018, vol. 11, no. 4, pp. 73-83.
318. Nitovska I. O., Avilov I. D., Morgun B. V. The positive effect of antibiotic paromomycin compared with kanamycin for selection of transgenic plants with *nptII* gene on the example of *Nicotiana Tabacum*./ Factors in experimental evolution of organisms. 2015. Vol. 17. P. 270-273.
319. Ogawa T., Kawahigashi H., Toki S., Handa H. Efficient transformation of wheat by using a mutated rice acetolactate synthase gene as a selectable marker. *Plant Cell Reports*. 2008. 27. P. 1325-1331.
320. Olhoft P.M., Lin K., Galbraith J., Neisen N.C., Somers D.A. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep*. 2001. 20. P. 731-737.
321. Ortiz J., Reggiardo M., Ravizzini R. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Reports* .1996. 15. P. 877-881.

322. Palla K.J., Pijut P.M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Fraxinus americana* hypocotyls. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015. Vol. 120. P. 631–41.
323. Panathula Ch. The stimulatory effects of the antimicrobial agents Bavistin, Cefotaxime and Kanamycin on *in vitro* plant regeneration of *Centella asiatica* (L.) – An important anti-jaundice medicinal plant. *American Journal of Plant Sciences.* 2014. Vol. 5. 279–285.
324. Patnaik D., Khurana P. Genetic transformation of Indian bread (*T. estivum*) and pasta (*T. durum*) wheat by particle bombardment of mature embryo-derived calli. *BMC Plant Biology.* 2003. 3. P. 5-15.
325. Patnaik D., Khurana P. Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology. *Electronic J. Biotech.* 2001. 4. P. 74–102.
326. Patnaik D., Vishnudasan D., Khurana P. *Agrobacterium*-mediated transformation of mature embryos of *Triticum aestivum* and *Triticum durum*. *Curr. Sci.* 2006. Vol. 91. P. 307–317.
327. Peremarti A., Twyman R., Gomez-Galera S., Naqvi S., Farre' G., Sabalza M., Miralpeix B., Dashevskaya S., Yuan D., Ramessar K. Promoter diversity in multigene transformation. *Plant Mol Biol.* 2010. 73. P. 363–378.
328. Pirae, M., Vining, L.C. Use of degenerate primers and touchdown PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2002. V. 29. P. 1-5.
329. Pocza P., Varga I., Laos M. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods.* 2013. Vol. 9, № 6. 31 p.
330. Pokhylko S., Schwartau V., Pochinok V., Mykhalska L., Dugan O., Morgun B. Influence of *Gpc-B1* of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* on grain protein content in bread wheat. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* 05–08 July 2017, Minsk, Belarus, 2017, P. 417.
331. Pokhylko S.Yu., Schwartau V.V., Mykhalska L.M., Dugan O.M., Morgun B.V. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Biotechnologia Acta*, 2016, V. 9, No. 5, P. 64–69.
332. Polishchuk S.S., Kyrdoхло E.K., Mykhalska L.M., Morgun B.V., Pokhylko S.Yu., Rybalka O.I., Schwartau V.V. Quantification of trace elements Fe, Zn, Mn, Se in barley grain. *Agricultural Science and Practice.* 2016, Vol. 3, No. 1, P. 49–54.
333. Ral J., Bowerman A., Li Z. Down-regulation of Glucan, Water-Dikinase activity in wheat endosperm increases vegetative biomass and yield. *Plant Biotechnol. J.* 2012. 10, N 7. P. 871–882.

334. Rao, J., Yang, L., Guo, J., Quan, S., Chen, G., Zhao, X., Zhang, D. and Shi, J. Development of event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for the transgenic maize BVLA430101, *European Food Research and Technology*, 2016, vol. 242, no 8, pp. 1277-1284.
335. Rasco-Gaunt S., Riley A., Cannel M., Barcelo P. , Lazzeri P. Procedures allowing the transformation of a range of European elite wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties via particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*. 2001. 52. P. 865–874.
336. Rashid U., Ali S., Ali G., Ayub N., Masood M. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic J. of Biotechnology*. 2009. 12. P. 4-5.
337. Rashid H. Effect of bacterial culture density and Acetosyringone concentration on *Agrobacterium* mediated transformation in wheat. *Pak. J. Bot.* 2010. Vol. 42. P. 4183–4189.
338. Razi Z., Rahnama H. Factors affecting delivery of DREB1A gene in maize B73 split-seeds via biolistic system. *Iranian journal of genetics and plant breeding*, 2012. Vol. 1. P. 36-43.
339. Reddy S. H. Influence of bavistin and silver thiosulphate on *in vitro* regeneration of *Asclepias curassavica* (L.) using nodal explants. *American Journal of Plant Sciences*. 2012. Vol. 3. P. 941–946.
340. Richard L., Ramon A., Bergvinson D., Jarrad R., Zhen Y., Michael J. The present and future role of insect-resistant genetically modified maize in IPM. *Integration of Insect- Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs*. 2008. Vol. 5. P. 119-158.
341. Robert L. Dimethylglycine. *Encyclopedia of autism spectrum disorders*. 2013. P. 976-977.
342. Rodriguez C., Kanobe C., Shanahan J., Robertson A. Seed treatments enhance photosynthesis in maize seedlings by reducing infection with *Fusarium spp.* and consequent disease development in maize. *European Journal of Plant Pathology*. 2009. Vol. 126. P. 343-347.
343. Rooke L., Bekes F., Fido R., Barro F., Gras P., Tatham A., Barcelo P., Lazzeri P., Shewry P. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J. of Cereal Science*. 1990. 30. P.115–120.
344. Rubie, C. Multistep-touchdown vectorette-PCR-a rapid technique for the identification of IVS in genes. *Biotechniques*. 1999. V. 27. P. 414-418.

345. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988. V. 239. P. 487-491.
346. Sairam R.V., Parani M., Franklin G. Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation . *Genome*. 2003. 46. P. 323-329.
347. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2nd ed. - 1989.
348. Sarker R., Biswas A. *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Culture*. 2002. Vol. 12. P. 155–165.
349. Sawahel W. Hassan A. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnology Letters*. 2002. 24. P. 721-725.
350. Schnell, J., Steele, M., Bean, J., Neuspiel, M., Girard, C., Dormann, N., Pearson, C., Savoie, A., Bourbonniere, L. and Macdonald, P. A comparative analysis of insertional effects in genetically engineered plants: considerations for pre-market assessments, *Transgenic Research*, 2015, vol. 24, no. 1, pp. 1-17.
351. Shabir H., Saroj K., Mohammad A., Vinay K., Sena M. Transgenic Approaches for Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*. 2016. P. 345-396.
352. Shah D.M. Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997. 8. P.208-214.
353. Sharma H., Sharma K., Seetharama N., Ortiz R. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 15 August 2000, Available from: <http://www.ejb.org/content/vol3/issue2/full/3> ISSN 0717-3458.
354. Sharma V. K. Influence of picloram and thidiazuron on high frequency plant regeneration in elite cultivars of wheat with long-term retention of morphogenecity using meristematic shoot segments. *Plant Breed*. 2005. Vol. 124. P. 242–246.
355. Shih-Y., Mei-L., Shu-J., Yu-Ch. Characterization of osmolyte betaine synthesizing sarcosine dimethylglycine N-methyltransferase from *Methanohalophilus portucalensis* II *Archives of Microbiology*. 2009. Vol. 191. P. 735-743.
356. Shou H., Bordallo P., Wang K. Expression of the Nicotiana protein kinase (NPK1) enhanced drought tolerance in transgenic maize. *J.Exp. Bot*. 2004. Vol. 55. P. 1013-1019.

357. Shou H., Frame B/R., Whitham S.A., Wang K. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Molecular Breeding*. 2004. Vol. 13. P. 201-208.
358. Shrawat A.K., Armstrong C.L. Development and application of genetic engineering for wheat improvement. *Critical Reviews in Plant Sciences* Volume 37, 2018, Issue 5, pp.335-421
359. Sidorov V., Gilbertson L., Addae P., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep.* 2006. 25. P. 320-328.
360. Sidorov V., Duncan D. *Agrobacterium*-mediated maize transformation: immature embryos versus callus. *Methods of Molecular Biology*. 2009. Vol. 526. P. 47–58.
361. Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing, *Cell*, 2001, 107, pp. 465-476.
362. Symonenko Yu V., Kyriienko A. V, Shcherbak N. L, Kuchuk M. V, M. F. Parii M. F. *In vitro* plant regeneration from mature embryos of amphidiploid spelt *Triticum spelta* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* Published: 10 February 2021
363. Symonenko Yu.V., Varchenko O.I., Kuchuk M.V., Parii M.F. Comparison of the GFP gene expression levels after *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Nicotiana rustica* L. by constructions with different promotor sequences. *Cytology and Genetics*, 2020, 54 (6) pp. 35-44.
364. Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J., Al-Niemi T., Dyer W., Ho T., Qu R. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Science* . 2000. 155. P. 1–9.
365. Somma M. Extraction and purification of DNA. Session 4. In: Training Course on the Analisis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms – User Manual. Edited by M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede European Commission, DJ joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg, 2006, 229 pp.
366. Songstad D.D., Duncan D.R., Widholm J.M. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, silver nitrate, and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures. *Plant Cell Rep.* 1988. Vol. 7. - P. 262-265.
367. Sparks C., Doherty A., Jones H. Genetic transformation of wheat via *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. *Methods Mol Biol.* 2014. 1099. P. 235–50.

368. Stachel, S. E., E. Messens, M. Van Montagu, and P. Zambryski. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 1986. 318. P. 624-629.
369. Stepanenko A., Lakhneko O., Morgun B., Borisjuk N. Isolation and characterization of rye *SbeIIa* and *SbeIIb* genes. The 3rd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences (3rd IPFS International Symposium), Fuzhou, China, December 15-18, 2018, P. 37.
370. Stepanenko O.V., Stepanenko A.I., Kuzminskiy Ye.V., Morgun B.V. Identification of *Psy1* genes alleles responsible for carotenoid accumulation in wheat grains. *Biotechnology Acta*. 2017, V. 10, No. 2, P. 57–66
371. Stoger E., Vaquero C., Torres E., Sack M., Nicholson L., Drossard J., Williams S., Keen D., Perrin Y., Christou P., Fischer R. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*. 2004. 42. P. 583-590.
372. Stoykova P., Stoeva-Popova P. PMI (manA) as a non antibiotic selectable marker gene in plant Biotechnology. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2011. 105. P. 141-148.
373. Strotbek C, Krinninger S, Frank W. The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *Int J Dev Biol*. 2013; 57(6-8):553-64.
374. Studer E., Dahinden I., Lüthy J., Hübner P. Nachweis des gentechnisch veränderten “Maximizer”-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaction (PCR). *Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene*. 1997. 88. S. 515-524.
375. Subramanyam K. Assessment of aactors influencing the *Agrobacterium*-mediated in planta seed transformation of brinjal (*Solanum melongena* L.). *Appl Biochem Biotechnol*. 2013. Vol. 171. № 2. P. 450–68.
376. Sujana P., Naidu C. Influence of Bavistin, Cefotaxime, Kanamycin and Silver Thiosulphate on plant regeneration of *Mentha piperita* (L.) – An important multipurpose medicinal plant. *Journal of Phytology*. 2011. Vol. 3. № 5. P. 36–40.
377. Supartana P., Shimizu T., Nogawa M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. of Bioscience and Bioengineering* .2006. 102. P. 162-170.
378. Tang H. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut of somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep*. 2000. Vol. 19. P. 881–887.

379. Tao L, Yin G., Du L., Shi Z. Improvement of plant regeneration from immature embryos of wheat infected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Agricultural Sciences in China*. 2011. 10. P. 317-326.
380. Taranenko A.M., Sakhno L.O., Morgun B.V., Kuchuk M.V. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants. *Biotechnologia Acta*. 2015, V. 8, No. 2, P. 52–57.
381. Taverniers I., Papazova N., Bertheau Y., De Loose M., Holst-Jensen A. Gene stacking in transgenic plants: towards compliance between definitions, terminology, and detection within the EU regulatory framework. *Environ Biosafety Res* . 2008 . 7. P. 197–218.
382. Tempe J. Thermosensitive step associated with transfer of the Ti plasmid during conjugation: Possible relation to transformation in crown gall. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*. 1977. Vol. 74. № 7. P. 2848–2849.
383. Tishchenko, O.M., Komisarenko, A.G., Mykhalska, S.I. Sergeeva, L.E., Adamenko, N.I., Morgun, B.V. and Kochetov, A.V. *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) *in vitro* and *in planta* using LBA4404 strain harboring binary vector pBI2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene, *Cytology and Genetics*, 2014, vol. 48, no 4, pp. 218-226.
384. Todorovska E. Retrotransposons and their role in plant–genome evolution, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2007, no 21, pp. 294-305.
385. Tran T., Sanan-Mishra N. Effect of antibiotics on callus regeneration uring transformation of IR64 rice. *Biotechnology Reports*. 2015. Vol. 7. P. 143–149.
386. Trick H.N., Finer J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Transgenic research*. 1997. 6. P. 329-336.
387. Uze M., Potrykus I., Sautter C. Factors influencing T-DNA transfer from *Agrobacterium* to precultured immature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications*. 2000. 28. P. 17-23.
388. Vain P. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnol. J*. 2007, N 5. P.221–229.
389. Varshney R.K., Mahendar T., Aggarwal R.K. Genic molecular markers in plants: development and applications. In *Genomic-assisted crop improvement: vol.1. genomics approaches and platforms*. New York: Springer, 2007. – P.13-29.
390. Vasil I. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*. 2007. 26. P. 1133-1154.

391. Vasil I., Vasil V. Transgenic cereals: *Triticum aestivum* (wheat). In: Vasil, I.K., ed. *Molecular Improvement of Cereal Crops*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, The Netherlands. – 2000. – P. 137–147.
392. Vasil V., Lu C.-Y., Vasil I. Proliferation and plant regeneration from the nodal region of *Zea mays* L.(Maize, Gramineae) embryos. *Amer. J. Bot.* 1983. 70 (6). P.951-954.
393. Vencill W.K., Nichols R.L., Webster T.M. Herbicide resistance: toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Science*. 2012. Special Issue. P.2–30.
394. Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S. I., and Moazed, D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science*, 2004, 303, pp.672-676.
395. Vicient C.M. Transcriptional activity of transposable elements in maize, *BMC Genomics*, 2010, vol. 11, no. 601, pp. 1-10.
396. Villani M.E., Morgun B., Brunetti P., Marusic C., Lombardi R., Pisoni I., Bacci C., Desiderio A., Benvenuto E., Donini M. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, V. 7, No. 1, P. 59–72.
397. Vishnudas D., Tripathi M., Rao U., Khurana P. Assessment of nematode resistance in wheat transgenic plants expressing potato proteinase inhibitor (*pin2*) gene. *Transgenic research*. 2005. 14. P. 665-675.
398. Wang Y. Q., Xiao X. G., Zhang A. M. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). – 2002. – Vol. 29. – P. 260–265.
399. Weeks J., Koshiyama K., Maier-Greiner U. Wheat transformation using cyanamide as a new selective agent. *Crop Sci.* 2000. 40. P. 1749–1754.
400. Weinthal D., Tovkach A., Zeevi V., Tzfira T. Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. *Trends Plant Sci.* 2010. 15. P. 308–321.
401. Wu H, Doherty A., Jones H. *Agrobacterium*-mediated transformation of bread and durum wheat using freshly isolated immature embryos, In: *Transgenic wheat, barley and oats*: Humana Press, New York. 2009. P. 93-103.
402. Wu H., Doherty A., Jones H. Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. Durum) using additional virulence genes. *Transgenic research*. 2008. 17. P. 425-436.

403. Wu H., Sparks C., Amoah B., Jones H. Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Reports*. 2003. 21. P. 659-668.
404. Wu, R., Guo, W., Wang, X., Wang, X., Zhuang, T., Clarke, J. and Liu, B. Unintended consequence of plant transformation: biolistic transformation caused transpositional activation of an endogenous retrotransposon *Tos17* in rice ssp. *japonica* cv. *Matsumae*, *Plant Cell Reports*, 2009, vol. 28, no 7, pp. 1043-1051.
405. Xiayi K. Xiuwen Z., Heping S., Baojian L. Electroporation of immature embryos . *Transgenic Research*. 1996. 5. P. 219-221.
406. Xu Y. Molecular plant breeding. – Wallington. UK: CAB-international. – 2010. – 752 p.
407. Xu, Y., Xie, C., Wan, J., He, Z., Prasanna, B. Marker-assisted selection in cereals: platforms, strategies and examples. *Cereal Genomics II*. 2013. P. 375-411.
408. Yabe S., Iwata H. Genomics-assisted breeding in minor and pseudo-cereals. *Breed Sci.*, 2020, 70(1), pp. 19–31.
409. Yang B., Ding L., Yao L. Effect of seedling ages and inoculation durations with *Agrobacterium tumefaciens* on transformation frequency of the wheat wounded apical meristem. *Molecular Plant Breeding*. 2008. 6. P. 358-362.
410. Yao Q. Optimization of wheat co-transformation procedure with gene cassettes resulted in an improvement in transformation frequency. *Mol. Biol. Rep.* 2007. 34. P. 61–67.
411. Yarizadea A., Arama F., Niazia A., Ghasemib Y. Evaluation of effect of β -lactam antibiotics on suppression of different strains of *Agrobacterium tumefaciens* and on wheat mature embryo culture. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. Vol. 8. P. 267–276.
412. Yasmeeen A. *In planta* transformation of tomato. *Plant Mol. Biol Report*. 2009. Vol. 27. P. 20–28.
413. Yong G. A maize phytochrome-interacting factor 3 improves drought and salt stress tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*. 2015. Vol. 87. P. 413-428.
414. Yu G. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Immature ymbryo Transformation System and Transformation of Glyphosate-Resistant Gene *2mG2-EPSPS* in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 2013. Vol. 12. № 12. P. 2134–2142.
415. Yuzbasioglu G., Marakli S., Gozukirmizi N. Screening of *Oryza sativa* L. for *hpt* gene and evaluation of *hpt* positive samples using *Houba* retransposon-based IRAP markers, *Turk. J. Agric. Res.*, 2017, vol. 4, no. 1, pp. 59-64.

416. Yves B., Audrey C., Marcal S., Jacqueline G. Toward the identification of genes underlying maize QTLs for lignin content, focusing on colocalizations with lignin biosynthetic genes and their regulatory MYB and NAC transcription factors. *Molecular Breeding*. 2015. P. 1-23.
417. Zale J., Agarwal S., Loar S., Steber C. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*. 2009. 28. P. 903-913.
418. Zhao T., Zhao S., Chen H. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Reports*. 2006. 25. P. 1199-1204.
419. Zhao Z. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize . *Molecular Breeding*. 2001. Vol. 8. P. 323–333.
420. Zhou Y., Chen C., Peterson A., Stepanenko A., Kishchenko O., Lakhneko O., Morgun B., Borisjuk N. Comparative biodiversity of duckweeds in Central Ukraine and Eastern China and their potential for remediation of wastewater. The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018), Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018.
421. Ziemienowicz A. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2013. P. 1–8.
422. Zimmermann A., Liniger M., Lüth J., Pauli U. A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested-PCR system. *Lebensm-Wiss. U.- Technol*. 2010. 31. P. 664-667.

ДОДАТОК А



Київський національний університет
імені Тараса Шевченка

Навчально-науковий центр
«ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТА
МЕДИЦИНИ»



Київський національний університет імені Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13, 01601 Київ, Україна
тел. +38 044 5213598; e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua
<http://biology.univ.kiev.ua>

№ 036/2.54
від 01.09.2021р.

ДОВІДКА

про впровадження результатів дисертаційного дослідження

Засвідчуємо, що результати докторського дисертаційного дослідження Моргуна Богдана Володимировича на тему «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції» використані співробітниками кафедри загальної та медичної генетики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка при підготовці та викладанні навчальних курсів «Генетика рослин» та «Основи селекції», при розробці лабораторних і практичних занять для підготовки студентів освітнього рівня «Бакалавр» спеціальності «Біологія». Впровадження отриманих за дисертаційною роботою результатів дослідження в навчальний процес підвищує якість підготовки студентів, відображає стан та перспективи розвитку наукових досліджень в Україні та світі.

Директор ННЦ «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету
імені Тараса Шевченка,
доктор біологічних наук, професор



Людмила ОСТАПЧЕНКО

Завідувач кафедри
загальної та медичної генетики
доктор біологічних наук, професор

Сергій ДЕМИДОВ

ДОДАТОК Б



УКРАЇНА

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”

ФАКУЛЬТЕТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І БІОТЕХНІКИ

03056, Київ-56, проспект Перемоги, 37 тел.: 204-94-52, тел.fax: 204-83-12
e-mail: biotech@kpi.ua

№ 3300/2-671/Від 26.07.21

ДОВІДКА

про впровадження результатів дисертаційного дослідження

Засвідчуємо, що результати докторського дисертаційного дослідження Моргуна Богдана Володимировича на тему «Поліпшення культурних злаків методами генетичної інженерії та маркер-допоміжної селекції» використано в навчальних курсах «Біоінженерія» та «Молекулярна біотехнологія» при розробці лекційних, лабораторних і практичних занять для підготовки студентів за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія» співробітниками кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології факультету біотехнології і біотехніки Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського». Впровадження отриманих за дисертаційною роботою результатів дослідження в навчальний процес підвищує якість підготовки студентів, відображає стан та перспективи розвитку наукових досліджень в Україні та світі.

В.о. декана факультету
біотехнології і біотехніки,
д.т.н.

Тетяна ТОДОСІЙЧУК
м.п.



В.о. завідувача кафедри біоенергетики,
біоінформатики та екобіотехнології,
д.т.н.

Наталія ГОЛУБ

ДОДАТОК В

СПИСОК ОСНОВНИХ ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових та іноземних наукових виданнях

1. Lakhneko, O., Danchenko, M., **Morgun, B.**, Kováč, A., Majerová, P. & Škultéty, L., 2020. Comprehensive comparison of clinically relevant grain proteins in modern and traditional bread wheat cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), pp. 3445(1-21). DOI: 10.3390/ijms21103445 (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
2. Рибалка, О.І., Моргун, В.В. та **Моргун, Б.В.**, 2020. Кольорове зерно пшениці і ячменю – нова стратегія селекції зернових культур із високою біологічною цінністю зерна. *Фізіологія рослин і генетика*, 52(2), с. 95–127. DOI: 10.15407/frg2020.02.095 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
3. Nitovska, I.O., Abraimova, O.Y., Duplij, V.P., Derkach, K.V., Satarova, T.M., Rudas, V.A., Cherchel, V.Yu., Dziubetskyi, B.V. & **Morgun, B.V.**, 2019. Application of beta-glucuronidase transient expression for selection of maize genotypes competent for genetic transformation. *Cytology and Genetics*, 53(6), pp. 451–458. DOI: 10.3103/S0095452719060082. (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
4. **Morgun, B.V.** & Dubrovna, O.V., 2019. IRAP analysis of transgenic wheat plants with a double-stranded RNA suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Cytology and Genetics*, 53(5), pp. 384–391. DOI: 10.3103/S0095452719050116. (60 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
5. Рибалка, О.І., Моргун, В.В., **Моргун, Б.В.** та Поліщук, С.С., 2019. Генетичні основи нового напрямку селекції оригінальних за якістю зерна класів пшениці (*Triticum aestivum* L.) і тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack). *Фізіологія рослин і генетика*, 51(3), с. 207–240. DOI:10.15407/frg2019.03.207 (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
6. Рибалка, О.І., Швартау, В.В., Поліщук, С.С. та **Моргун, Б.В.**, 2019. Зниження вмісту фітатів як засіб біофортифікації ячменю за мінеральним складом зерна. *Фізіологія рослин і генетика*, 51(2), с. 95–113. DOI: 10.15407/frg2019.02.095 (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
7. Nitovska, I.O., Vasylenko, M.Yu. & **Morgun, B.V.**, 2018. Investigation of monocotyledon introns influence on the expression of transgenes in dicotyledonous plants in the genus *Nicotiana*. *Biotechnology Acta*, 11(4), pp. 73–83. DOI: 10.15407/biotech11.04.073 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)

8. Лялько, І.І., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2018. Аналіз мейозу в сортів пшениці озимої м'якої – носіїв пшенично-житніх транслокацій 1BL.1RS та 1AL.1RS. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 16(2), с. 174–182, DOI: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1055 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
9. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Поліщук, С.С., 2018. *Gpc-B1* (NAM-B1) ген як новий генетичний ресурс у селекції пшениці на підвищення вмісту білка в зерні та мікроелементів. *Фізіологія рослин і генетика*, 50(4), с. 279–298. DOI: 10.15407/frg2018.04.279 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
10. Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2018. Сучасний стан досліджень *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 50(3), с. 187–217. DOI: 10.15407/frg2018.03.187 (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
11. Stepanenko, O.V., Stepanenko, A.I., Kuzminskiy, Ye.V. & **Morgun, B.V.**, 2017. Identification of *Psy1* genes alleles responsible for carotenoid accumulation in wheat grains. *Biotechnologia Acta*, 10(2), pp. 57–66. DOI: 10.15407/biotech10.02.057 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
12. Михальська, Л.М., Похилько, С.Ю., Швартау, В.В., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Дослідження вмісту білка в гібридних лініях пшениці – носіях гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Біологічні студії / Studia Biologica*, 11(3–4), с. 34–35, DOI: 10.30970/sbi.1103.563 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).
13. Похилько, С.Ю., Швартау, В.В., Починок, В.М., Михальська, Л.М., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Комплексний аналіз вмісту загального білка в зерні м'якої пшениці, яка містить ген *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 15(1), с. 52–57. DOI: 10.7124/visnyk.utgis.15.1.712 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
14. Степаненко, О.В., Музафарова, В.А., Степаненко, А.І., Кузьмінський, Є.В., Рябчун, В.К. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Комплексна молекулярно-генетична оцінка генофонду ячменю ярого за напрямками використання. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(4), с. 328–338. DOI: 10.15407/frg2017.04.328 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)
15. **Моргун, Б.В.**, Похилько, С.Ю., Починок, В.М., Дуплій, В.П., Дуган, О.М., Христан, О.О. та Степаненко, А.І., 2017. Генетичне різноманіття пуринодолінових генів серед ліній пшениці м'якої, носіїв *Gpc-B1* із *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фізіологія рослин і генетика*, 49(3), с. 229–236. DOI: 10.15407/frg2017.03.229 (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)
16. Похилько, С.Ю., Степаненко, А.І., Дуган, О.М. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Визначення алельного стану генів *Glu-1* в гібридних сім'ях, носіїв гена *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 21, с.

168–173. DOI: 10.7124/FEEO.v21.829 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)

17. Нітовська, І.О., Комарницький, І.К. та **Моргун, Б.В.**, 2017. Селекція на гліфосаті трансгенних калюсних ліній кукурудзи генотипів, районованих в Україні. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 20, с. 237–242. DOI: 10.7124/FEEO.v20.771 (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)

18. Степаненко, Е.В., Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.**, Рыбалка, А.И. и Кузьминский, Е.В., 2016. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. *Вестник «ЮКГФА» (Республиканский научный журнал «Вестник Южно-Казахстанской государственной фармацевтической академии»*. Республика Казахстан, г. Шымкент. 4(77), с. 29–31. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

19. Lakhneko, O.R., **Morgun, B.V.**, Kalendar, R.M., Stepanenko, A.I., Troianovska, A.V. & Rybalka, O.I., 2016. SSR analysis in the study of genetic diversity and similarity of barley cultivars. *Biotechnologia Acta*, 9(3), pp. 61–68. <https://doi.org/10.15407/biotech9.03.061> (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті)

20. Pokhylko, S.Yu., Schwartau, V.V., Mykhalska, L.M., Dugan, O.M. & **Morgun, B.V.**, 2016. ICP-MS analysis of bread wheat carrying the *Gpc-B1* gene of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Biotechnologia Acta*, 9(5), pp. 64–69. DOI: 10.15407/biotech9.05.064 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

21. **Моргун, Б.В.**, 2016. Стан та перспективи використання пшенично-житніх транслокацій у селекції озимої м'якої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(4), с. 324–343. DOI: 10.15407/frg2016.04.324

22. Моргун, В.В., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Сучасні біотехнології отримання стійких до стресів рослин пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(3), с. 196–214. DOI: 10.15407/frg2016.03.196 (30 % авторства: , аналіз результатів, написання статті).

23. Горбатюк, І.Р., Щербак, Н.Л., Банникова, М.О., Великожон, Л.Г., Кучук, М.В. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин пшениці сорту Зимоярка трансформацією *in vitro*. *Фізіологія рослин і генетика*, 48(1), с. 65–74. DOI: 10.15407/frg2016.01.065 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

24. **Моргун, Б.В.**, Лялько, І.І., Степаненко, А.І., Бавол, А.В. та Великожон, Л.Г., 2016. Цитологічна та молекулярно-генетична характеристика сортів озимої м'якої пшениці, отриманих за інтрогресивної селекції та мутагенезу. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 19, с. 167–171. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

25. Похилько, С.Ю., Трояновська, А.В., Степаненко, А.І., Урбанович, О.Ю., Дуган, О.М., Рибалка, О.І. та **Моргун, Б.В.**, 2016. Дослідження генотипів пшениці м'якої з

перенесеним геном *Gpc-B1* від *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 18, с. 132–136. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

26. Polishchuk, S.S., Kyrdoхло, E.K., Mykhalska, L.M., **Morgun, B.V.**, Pokhylko, S.Yu., Rybalka, O.I. & Schwartau, V.V., 2016. Quantification of trace elements Fe, Zn, Mn, Se in barley grain. *Agricultural Science and Practice*, 3(1), pp. 49–54. <https://doi.org/10.15407/agrisp3.01.049> (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

27. Gorbatiuk, I.R., Bovol, A.V., Holubenko, A.V. & **Morgun, B.V.**, 2015. Effect of synthetic auxin like growth regulators on callus regenerative ability of common wheat cv. Zymoyarka. *Biotechnologia Acta*, 8(1), pp. 56–62. doi: 10.15407/biotech8.01.056 (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті)

28. Taranenکو, A.M., Sakhno, L.O., **Morgun, B.V.** & Kuchuk M.V. Comparative molecular genetic analysis between Ukrainian and EU registered glyphosate-tolerant rapeseed transgenic plants. *Biotechnologia Acta*. 2015, 8(2), pp. 52–57. doi: 10.15407/biotech8.02.052 (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

29. Горбатюк, І.Р., Бавол, А.В., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. *Agrobacterium*-опосередкована трансформація *in planta* пшениці м'якої озимого сорту Подолянка. *Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія*, 24(1153), с. 47–53. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

30. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Тараненко, А.М., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Вплив регуляторів росту на регенераційну здатність калюсу м'якої пшениці сорту Зимоярка. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(6), с. 514–525. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

31. Тищенко, Е.Н. и **Моргун, Б.В.**, 2015. Генетическая инженерия по повышению осмотолерантности культурных злаковых растений с использованием генов транскрипционных факторов DREB и AREB/ABF. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(5), с. 371–392. (40 % авторства: аналіз результатів, написання статті).

32. Рибалка, О.І., Моргун, В.В., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2015. Агрономічний потенціал і перспективи тритикале. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(2), с. 95–111. (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

33. **Моргун, Б.В.**, Степаненко, О.В., Степаненко, А.І. та Рибалка, О.І., 2015. Молекулярно-генетична ідентифікація поліморфізму генів *Wx* у гібридах м'якої пшениці за допомогою мультиплексних полімеразних ланцюгових реакцій. *Фізіологія рослин і генетика*, 47(1), с. 25–35. (60 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

34. Степаненко, А.І., Степаненко, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Поліморфізм генів пшениці, які визначають якісні ознаки, у харчових продуктах. *Фактори*

експериментальної еволюції організмів, 16, с. 161–165. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

35. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2015. Позитивний вплив антибіотика тиментину на елімінацію *Agrobacterium tumefaciens* та регенерацію *in vitro* пшениці м'якої *Triticum aestivum*. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 17, с. 136–140. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

36. **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Лялько, І.І., Великожон, Л.Г. та Степаненко, А.І., 2014. Молекулярно-генетична ідентифікація та цитологічні особливості сортів озимої м'якої пшениці з пшенично-житньою транслокацією. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 15, с. 220–223. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

37. Степаненко, А.І., Благодарова, О.М., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В. та Рибалка, О.І., 2014. Детекція пшенично-житніх транслокацій за допомогою ДНК-маркерів та електрофорезу білків. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 12(1), с. 78–83. (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

38. Степаненко, А.І., Трояновська, А.В., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Великожон, Л.Г., Рибалка, О.І. та Поліщук, С.С., 2014. Маркерний аналіз генів поліфенолоксидази (РРО) у сортах м'якої пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(6), с. 490–497. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

39. **Моргун, Б.В.**, Степаненко, А.І., Чугункова, Т.В., Лялько, І.І., Степаненко, О.В. та Великожон, Л.Г., 2014. Молекулярне визначення локалізації житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(4), с. 319–324. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

40. Степаненко, О.В., **Моргун, Б.В.**, Рибалка, О.І., Степаненко, А.І. та Кузьмінський, Є.В., 2014. Виявлення алельних варіантів гена *wax* серед вітчизняних і зарубіжних сортів ячменю. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*, 3(95), с. 78–83. (25 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

41. Топчій, Т.В., Починок, В.М. та **Моргун, Б.В.**, 2014. Стійкість ліній озимої пшениці, створених способом віддаленої гібридизації, до комплексу хвороб та шкідників. *Фізіологія рослин і генетика*, 46(3), с. 230–235. (25 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

42. Бавол, А.В., Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Одержання та аналіз методом IRAP-PCR трансгенних клітинних ліній м'якої пшениці. *Biotechnologia Acta*, 6(6), с. 113–119. (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

43. Makarenko, R., Savchuk, O., Rumianceva, A., Ivashchuk, B., Cherep, M., Gorobec, S. & **Morgun, B.**, 2013. Cloning and molecular-genetic analysis *Deschampsia antarctica* mitochondrial sequences. *Вісник Київського національного університету імені*

Тараса Шевченка. Серія: Біологія, 2(64), pp. 45–47. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

44. Марковський, О.В., Банникова, М.О. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Виявлення сгу генів, які детермінують стійкість до комах, за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції у трансгенної кукурудзи. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 12, с. 276–280. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

45. **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Рибалка, О.І., Починок, В.М., Тарасюк, О.І. та Степаненко, А.І., 2013. Молекулярна ідентифікація алеля *Glu-B1a1* у сортах і лініях пшениці. *Фізіологія рослин і генетика*, 45(4), с. 290–295. (40 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

46. Рибалка, О. І., Поліщук, С. С., Кірдогло, Є. К. та **Моргун, Б.В.**, 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів голозернового ячменю харчового напрямку. *Физиология и биохимия культурных растений*, 45(3), с. 187–205. (20 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

47. Рибалка, О.І., Червоніс, М.В., **Моргун, Б.В.**, Починок, В.М. та Поліщук, С.С., 2013. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку технологічного використання зерна. *Физиология и биохимия культурных растений*, 45(1), с. 3–19. (10 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

48. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2012. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: генетика, біотехнологія та харчова цінність запасних білків. *Физиология и биохимия культурных растений*, 44(1), с. 3–22. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

49. Степаненко, А.І., **Моргун, Б.В.**, Чугункова, Т.В., Адаменко, Н.І. та Великожон, Л.Г., 2012. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 10(2), с. 311–318. (30 % авторства: планування та виконання експериментів, аналіз результатів, написання статті).

50. Рибалка, О.І., **Моргун, Б.В.** та Починок, В.М., 2011. Сучасні дослідження якості зерна пшениці у світі: біосинтез та накопичення запасних білків, структура, агрегація і реологія у зв'язку з технологією зернопродуктів. *Физиология и биохимия культурных растений*, 43(6), с. 463–477. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, обробка літератури, аналіз результатів, написання статті).

51. Ларченко, К.А. та **Моргун, Б.В.**, 2010. Ознаки якості зерна пшениці та методи їх поліпшення. *Физиология и биохимия культурных растений*, 42(6), с. 463–474. (40 % авторства: опрацювання літератури, аналіз результатів, написання статті).

52. Матвеева, А.Ю., Корж, Л.П., Христан, О.О., **Моргун, Б.В.** и Тищенко, Е.Н., 2010. Анализ компетенции *Agrobacterium*-опосредованной трансформации морфогенного каллуса инбредных линий кукурузы. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 9,

с. 308–313. (15 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

53. Villani, M.E., **Morgun, B.**, Brunetti, P., Marusic, C., Lombardi, R., Pisoni, I., Bacci, C., Desiderio, A., Benvenuto, E. & Donini, M., 2009. Plant pharming of a full-sized, tumour-targeting antibody using different expression strategies. *Plant Biotechnology Journal*, 7(1), pp. 59–72. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00371> (30 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

54. Дубровна, О.В. та **Моргун, Б.В.**, 2009. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля. *Физиология и биохимия культурных растений*, 41(6), с. 463–475. (40 % авторства: участь у плануванні та виконанні експериментів, аналіз результатів, написання статті).

Монографії

1. Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Поліщук С.С. *Ячмінь як продукт функціонального харчування*. К.: Логос, 2016. – 670 с. ISBN 978-617-7442-06-5 (40 % авторства: аналіз результатів, написання 4, 9–12 розділів).

2. **Моргун Б.В.**, Тищенко Е.Н. *Молекулярные биотехнологии по повышению устойчивости культурных злаков к осмотическим стрессам*. К.: Логос, 2014. – 221 с. ISBN 978-966-171-887-5 (60 % авторства: узагальнення матеріалів та укладання, написання монографії).

3. Дубровна О.В., **Моргун Б.В.**, Бавол А.В. *Біотехнології пшениці: клітинна селекція та генетична інженерія*. К.: Логос, 2014. – 375 с. ISBN 978-966-171-883-7 (30 % авторства: узагальнення матеріалів та укладання, написання монографії).

Патенти на винахід та корисні моделі

1. Патент України на винахід № 117974. Спосіб трансформації та селекції кукурудзи /Абраїмова О.Є., Нітовська І.О., **Моргун Б.В.**, Дзюбецький Б.В., Черчель В.Ю., Деркач К.В., Сатарова Т.М. / Заявники та патентовласники Державна установа Інститут зернових культур НААН України й Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Бюл. № 20, 2018 р. (20 % авторства: участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).

2. Патент України на корисну модель № 115633. Спосіб отримання трансформованих рослин м'якої пшениці методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсних культур апікального походження / Волч І.Р., Банникова М.О., Гнатюк І.С., **Моргун Б.В.** Заявник та патентовласник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. 19.10.2016. (30 % авторства: планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).

3. Патент України на корисну модель № 104264. Сніданок академіка Рибалки. /Рибалка О.І., **Моргун Б.В.**, Починок В.М. заявник та патентовласник Інститут фізіології рослин та генетики НАН України. Опубліковано: 25.01.2016, Бюл. № 2. (30 % авторства:

участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).

4. Патент України на корисну модель № 77331. Спосіб отримання трансгенних рослин кукурудзи за допомогою *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації *in planta*/ Матвеева О.Ю., Тищенко О.М., **Моргун Б.В.** Власник Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. Бюл. № 3, 2013 (30 % авторства: *участь у плануванні експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, участь у розробці винаходу).*

5. Патент України на корисну модель № 77768. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи NK603 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4. (40 % авторства: *планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).*

6. Патент України на корисну модель № 77769. Спосіб детекції трансформаційної події кукурудзи MON810 в генетично модифікованій рослині методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції/ **Моргун Б.В.**, Федоренко Т.В., Марковський О.В., Банникова М.О. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.02.2013, Бюл. № 4. (40 % авторства: *планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).*

7. Патент України на корисну модель № 61602 Спосіб визначення трансгенної лінії GA21 кукурудзи за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / **Моргун Б.В.**, Банникова М.О., Сатарова Т.М., Борисова В.В., Кучук М.В. Власник Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України. Опубліковано 25.07.2011, Бюл. № 14. (40 % авторства: *планування експериментів, узагальнення матеріалів, аналіз результатів, розробка винаходу).*

Авторські свідоцтва на сорти рослин

1. А.с. № 120154 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Сотниця**. Автори: Артемчук І.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Братушак С.П., Моргун В.В. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 423. (10 % авторства: *створено, описано, заявлено).*

2. А.с. № 120157 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Орійка**. Автори: Артемчук І.П., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Братушак С.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 3. 2014. С. 417. (10 % авторства: *створено, описано, заявлено).*

3. А.с. № 140640 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Придніпровська**. Автори: Братушак С.П., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Долежан Я. (Україна). Опубліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 242. (10 % авторства: *створено, описано, заявлено).*

4. А.с. № 140639 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Астарта**. Автори: **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Моргун В.В., Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2014. С. 12. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

5. А.с. № 141024 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Покрова**. Автори: **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 254. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

6. А.с. № 141023 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Софія Київська**. Автори: **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Моргун В.В. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 260. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

7. А.с. № 141028 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Здоба Київська**. Автори: **Моргун Б.В.**, Оксьом Л.Л., Моргун В.В. (Україна). Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2014. С. 236. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).

8. А.с. № 141112 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Коляда**. Автори: Артемчук І.П., Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2015. С. 374. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

9. А.с. № 160548 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Золото України**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., **Моргун Б.В.** (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 502. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

10. А.с. № 160512 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Новосмуглянка**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Скрипльов В.О., Оксьом Л.Л., **Моргун Б.В.** (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 504. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

11. А.с. № 160543 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Соломія**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2016. С. 511. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

12. А.с. № 170768 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Бужанка**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., Катеринчук О.М., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 371. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).

13. А.с. № 170769 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Бондарівна**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 370. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).

14. А.с. № 170770 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Зореслава**. Автори : Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна).

– Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 2. 2017. С. 385. (20 % авторства: створено, описано, заявлено).

15. А.с. № 171137 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Стрітенська**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 343. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

16. А.с. № 180225 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світогляд**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Катеринчук О.М., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 341. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

17. А.с. № 171142 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Городниця**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.** (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 325. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

18. А.с. № 171140 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Перлина Поділля**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.** (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 335. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

19. А.с. № 171138 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Боровиця**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2018. С. 321. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

20. А.с. № 180874 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світоч**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 485. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

21. А.с. № 180873 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Порадниця**. Автори: Моргун В.В., Оксьом В.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О., Гаврилюк М.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 1. 2019. С. 479. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

22. А.с. № 200479 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Січеслава**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 101. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

23. А.с. № 200483 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Плеяда**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Гаврилюк М.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 100. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

24. А.с. № 200488 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Донор Київський**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Починок В.М. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 104. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

25. А.с. № 200482 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Аміна**. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., **Моргун Б.В.**, Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 92. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

26. А.с. № 200481 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Джамала**. Автори: Моргун В.В., Починок В.М., **Моргун Б.В.**, Рибалка О.І., Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 4. 2020. С. 94. (10 % авторства: створено, описано, заявлено).

27. А.с. № 200788 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Академічна 100**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 250. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

28. А.с. № 200790 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Ювілейна Патона**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 295. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

29. А.с. № 200789 України. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Світязь**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Україна). – Оpubліковано в Бюлетні «Охорона прав на сорти рослин» № 6. 2020. С. 286. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

30. А.с. № 72491 Російської Федерації. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Астарта**. Автори: Моргун В.В., **Моргун Б.В.**, Оксьом В.П., Скрипльов В.О. (Російська Федерація). – Зареєстровано в Державному реєстрі охоронних селекційних досягнень Російської Федерації, 2018. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

31. А.с. № 730(3) Республіки Молдова. Пшениця м'яка озима (*Triticum aestivum* L.) **Сотниця**. Автори: Моргун В.В., Артемчук І.П., Братущак С.П., **Моргун Б.В.**, Скрипльов В.О. (Республіка Молдова). – Оpubліковано *Soiul este inclus in Catalogul Soiurilor de Plante al Republicii Moldova in anul 2018*. (15 % авторства: створено, описано, заявлено).

Основні тези наукових конференцій

1. Гав'яз, В.О., Салашний, Т.А., Великожон, Л.Г. та **Моргун, Б.В.** Генотипування синтетичних ліній пшениці за генами *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1* запасних білків глютенінів. XIV Всеукраїнська науково-практична конференція «*Біотехнологія XXI століття*», присвячена 135-річчю від дня народження Олександра Володимировича Палладіна (для студентів, аспірантів і молодих учених) 20.05.2020, Київ, КПІ ім. Ігоря Сікорського. С. 22.

2. Chen, G., Michael, T., Stepanenko, A., Zhou, Yu., Peterson, A., Kishchenko, O., Cui, D., Zhu, H., Lakhneko, O., **Morgun, B.**, Lam, E. & Borisjuk, N. Special arrangement of 5S rDNA in great duckweed, *Spirodela polyrhiza*: unusually low gene copy number, sequence divergence and precise chromosomal arrangement. *5th International ICDRA Conference on*

Duckweed Research and Applications. Weizmann Institute of Science. Rehovot, Israel. September 9-12, 2019. P. 59.

3. Chen, G., Michael, T., Zhou, Yu., Stepanenko, A., Peterson, A., Kishchenko, O., Lakhneko, O., **Morgun, B.**, Lam, E. & Borisjuk, N. Duckweed rDNA organization and evolution. *PAG XXVII - Plant & Animal Genome Conference*. San Diego, USA, January 2019. P.232.

4. Borisjuk, N., Shi, J., Bi, H., Peterson, A., Chen, C., Shavrukov, Y., Stepanenko, A., **Morgun, B.**, Utebayev, M., Hrmova, M. & Lopato, S. Diversity of grain and leaf surface aliphatic components in wheat. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018 P. 25.

5. Lakhneko, O., **Morgun, B.**, Skultety, L. & Danchenko, M. Comparative proteomics of grain allergens from several wheat varieties. *The 3rd International Plant Proteomic Organization (INPPO) World Congress*, Padova, Italy, September 9-12, 2018. P. 62.

6. Lakhneko, O., Stepanenko, A., Borysyuk, M., Stasik, O., Kuzminskiy, Ye. & **Morgun, B.** Sequence diversity of the gene coding for drought related transcription factor WRKY in selected Ukrainian wheat cultivars. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03–06, 2018, P. 395.

7. Lakhneko, O., Stepanenko, A., Borysyuk, M., Stasik, O. & **Morgun, B.** Sequence Polymorphism of the Gene Coding for Drought Related Wheat Transcription Factor WRKY2. *Resurrection plants: Hope for crop drought tolerance (ReHOPE)*, University of Plovdiv, Bulgaria, September 20-22, 2018, P. 45.

8. Stepanenko, A., Lakhneko, O., **Morgun, B.** & Borisjuk, N. Isolation and characterization of rye *SbeIIa* and *SbeIIb* genes. *The 3rd International Symposium on Innovations in Plant and Food Sciences (3rd IPFS International Symposium)*, Fuzhou, China, December 15-18, 2018, P. 37.

9. Zhou, Y., Chen, C., Peterson, A., Stepanenko, A., Kishchenko, O., Lakhneko, O., **Morgun, B.** & Borisjuk N. Comparative biodiversity of duckweeds in Central Ukraine and Eastern China and their potential for remediation of wastewater. *The 4th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2018)*, Kyiv, Ukraine, July 03-06, 2018. P.108.

10. Pokhylko, S., Schwartau, V., Pochinok, V., Mykhalska, L., Dugan, O. & **Morgun, B.** Influence of *Gpc-B1* of *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* on grain protein content in bread wheat. *The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity* (05–08 July 2017, Minsk, Belarus, 2017, P. 417.

11. Горбатюк, І.Р., Гнатюк, І.С., Трояновська, Л.В., Жалій, Н.А., Банникова, М.О. & **Моргун Б.В.** Визначення наявності та експресії трансгенів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації пшениці *Triticum aestivum* L. сортів Подолянка та Зимоярка. *Biotechnology for Agriculture and Environmental Protection: XII International Scientific-Applied Conference*. Odesa, Ukraine, September 7–10, 2016, P. 74–77.

12. Степаненко, Е.В., Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.**, Рыбалка, А.И. & Кузьминский, Е.В. Маркер-опосредованная селекция Wx-тритикале. *IV международная научная конференция молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии,*

медицины и фармации» 9-10 ноября 2016 года (г. Шымкент, Республика Казахстан). С.134-135.

13. Abraimova, O.E., Satarova, T.M., **Morgun, B.V.**, Nitovska I.O., Derkach, K.V., & Cherenkov, A.V. Effect of genetic transformation procedure on callus tissues of different maize genotypes. *Proceeding of 57th Annual Maize Genetics Conference*, March 12–15, 2015, Pheasant Run, St. Charles, Illinois, USA, P. 140.

14. Nitovska, I., Komarnytsky, I., Abraimova, O., Satarova, T. & **Morgun, B.** *Agrobacterium*-mediated transformation of maize of Ukrainian breeding genotypes. Abstracts of International Conference on *Advances in Cell Biology and Biotechnology*, Lviv, Ukraine, October 11-13, 2015, P. 44.

15. Трояновская, А.В., Похилько, С.Ю. & **Моргун, Б.В.**, Степаненко, А.И., Рыбалка, А.И., Полищук, С.С. & Починок, В.М. Определение ценных алелей гена *Gpc-B1* в генотипах мягкой пшеницы. Материалы II международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» г. Минск, 13-16 октября 2015 года. С. 128.

16. Макаренко, Р.А. & **Моргун, Б.В.** Клонирование и биоинформатический анализ последовательностей кДНК генов SHP малых гидрофобных белков антарктических мхов. *Вторая летняя школа по биоинформатике* (Санкт-Петербург, 27 июля – 1 августа 2014 года). Тезисы докладов. Санкт-Петербург: Свое издательство, 2014. С. 33–34.

17. Нитовская, И.А., Абраимова, О.Е., Сатарова, Т.Н. & **Моргун, Б.В.** Морфология растений кукурузы, выращенных в условиях теплицы, после регенерации *in vitro*. VI Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)», Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Ялта, Украина, 12–17 октября 2014 года, С. 44.

18. Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.** & Рыбалка, А.И. Молекулярные маркеры для детектирования в пшенице QTL *Gpc-B1*, перенесенного от *T. dicoccoides*. Сборник тезисов XIV Молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 16 апреля 2014 года, С. 50–52.

19. Степаненко, О.В., Рибалка, О.І., Степаненко, А.І. & **Моргун, Б.В.** Розробка низхідної ПЛР для визначення алельних варіантів гену *Wax* ячменю. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених «Проблеми і перспективи досліджень растительного мира», Нікітський ботанічний сад – ННЦ НААН України, Ялта, Україна, 13-16 травня 2014 року, С. 67–68.

20. Makarenko, R.O., Savchuk, O.P., Cherep, M.N., **Morgun, B.V.** Cloning and molecular genetic analyses of *Deschampsia antarctica* mitochondrial DNA sequences. *Conference Proceedings. Cell Technology Week*. Kiev, Ukraine, 14-17 May 2013, P. 52.

21. **Моргун, Б.В.** Молекулярні маркери як засіб вільного вибору. Abstracts of the 1st International Online Conference on “Plant Genomics and Biotechnology”, ІХБІГ НАН України, Kiev, Ukraine, December 23, 2013, С. 21.

22. Fedorenko, T., Markovskiy, O., Vlasova, O., Bannikova, M., Kuchuk, M. & **Morgun, B.** Detection of Resistant to Glyphosate Maize Transformation Events GA21, MON88017 and NK603 among Ukrainian Market Samples. *World Congress on In Vitro Biology*, Washington, USA, June 3-7, 2012, P.2057.

23. Степаненко, А.И., **Моргун, Б.В.** & Починок, В.М. Скрининг селекционных образцов пшеницы на наличие аллеля *al* локуса Glu-B1. Сборник тезисов XII Молодёжной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии», Москва, РФ, Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 11 апреля 2012 года, С. 64–65.

24. Михальская, Л.Н., **Моргун, Б.В.**, Швартау, В.В., Волков, К.С., Холодова, В.П. & Кузнецов, Вл.В. Икономика – инновационный комплексный подход к изучению ионного гомеостаза. Тезисы докладов Всероссийского симпозиума «Растение и стресс», 9-12 ноября 2010 года, Москва, РФ, С. 244–245.

25. Опанасенко, Т.Г., Смірнова, О.М., Порецька, О.І., Жолнер, Л.Г., Рудас, В.А. & **Моргун, Б.В.**, Кучук М.В. Моніторинг насіння кукурудзи зібраного в Україні на присутність трансформаційної події MON810. Друга міжнародна наукова конференція «Генетично модифіковані (біотехнологічні) рослини: перспективи використання та проблеми біобезпеки», 6-8 жовтня 2009 р., Київ, Україна. С. 94.